

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet

Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológia Tanszék

36. OTDK Biológia szekció

Funkcionális metagenomikai szűrés a különböző környezetekben előforduló β -laktamázok detekciója céljából

Nagrand Erika

Biológia MSc 2.évfolyam

Témavezetők:

Dr. Kintses Bálint, tudományos főmunkatárs

Dr. Gácsér Attila, belső konzulens



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

1 Tartalomjegyzék

1	Tartalomjegyzék.....	1
2	Bevezetés:	3
2.1	Az antibiotikumrezisztencia kérdése napjainkban:	3
2.2	Szerzett antibiotikumrezisztencia mechanizmusok.....	4
2.3	Az antibiotikumrezisztencia kutatás új módszere: a funkcionális metagenomika.....	6
2.4	A β -laktám antibiotikumok	8
2.5	A β -laktám antibiotikumok hatásmechanizmusa:	10
2.6	A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mechanizmusai:.....	10
2.7	A β -laktamázok karakterizálása:	11
3	Célkitűzés.....	12
4	Anyagok, eszközök és módszerek:.....	13
4.1	Mintagyűjtés	13
4.2	Metagenomi és genomi DNS izolálás környezeti mintákból és klinikai izolátumokból	14
4.3	A genomi és metagenomi DNS fragmentálása MluCI restrikciós enzimmel.....	15
4.4	Az emésztett minták méretszelekciója	16
4.5	pZE21-p15A plazmid előkészítése klónozáshoz:	17
4.6	Ligálás és kompetens sejtbe juttatás:.....	18
4.7	Metagenomikai és genomi könyvtárak E. coli BW25113 törzsébe juttatása:	19
4.8	Felhasznált Antibiotikumok:.....	20
4.9	Minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározás.....	20
4.10	Hatásszűrés MHB-grádiens lemezen, rezisztens kolóniák összegyűjtése:	21
4.11	Hibrid szekvenálás a rezisztencia gének azonosítására:	23
5	Eredmények és értékelésük:.....	25
5.1	Elkészített metagenomikai könyvtárak mérete:	25
5.2	Rezisztens kolóniaszámok a hatásszűrés során és főbb összefüggéseik:	26

5.3	Hibrid szekvenálással azonosított ARG-k:	28
6	Összefoglalás:	31
7	Függelék:	33
8	Irodalomjegyzék:	34
9	Ábrajegyzék:	38
9.1	Táblázatjegyzék.....	39
10	Köszönetnyilvánítás.....	39

2 Bevezetés:

2.1 Az antibiotikumrezisztencia kérdése napjainkban:

Napjainkban évente 700000 ember hal meg antibiotikumrezisztens fertőzések következtében, de becslések szerint 2050-re ez a szám a 10 milliót is elérheti, így az egyik vezető halálokká válhat. Ezekhez a számadatokhoz nagymértékben hozzájárul az antibiotikumok túlzott és nem minden esetben indokolt használata (Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017). A felelőtlen használat nem csupán a betegellátásban, hanem a mezőgazdaságban is nagy problémát okoz (Manyi-Loh és mtsai. 2018). Az ennek eredményeként létrejövő antibiotikumrezisztens baktériumok emberek halálát okozzák, illetve a kórházak megfelelő működését is veszélyeztetik, hiszen a hatásukat veszített antibiotikumok következtében egy transzplantáció vagy egy egyszerű műtét is körülményessé válhat a jövőben (Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017; Sommer és mtsai. 2017).

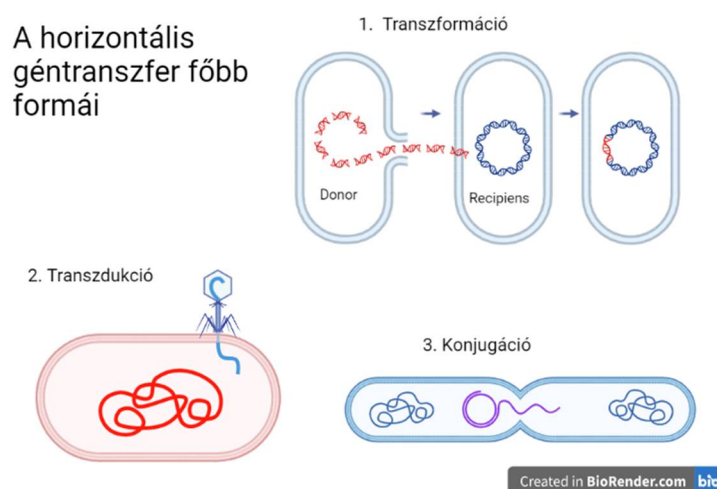
Az antibiotikumrezisztencia, vagyis hogy a kórokozók ellenállnak az antibiotikumok hatásának, távolról sem újként jellemezhető. A penicillint Fleming 1928-ban fedezte fel, de már az 1945-ben tartott Nobel-díjas előadásában felhívta a figyelmet az antibiotikumrezisztens kórokozók elterjedésének veszélyére (Alexander Fleming | Biography, Education, Discovery, Nobel Prize, & Facts | Britannica; Fleming 1945). Már az 1940-es években regisztráltak olyan antibiotikumrezisztens baktériumokat, amelyek rendelkeztek olyan enzimekkel, amelyek hidrolizálták a penicillin G-t. Emellett már 25 évvel a penicillin felfedezését követően járványos méreteket öltött a penicillinrezisztens *Staphylococcus aureus* előfordulása. A pandémia végét egy új antibiotikum, a methicillin felfedezése jelentette (Chambers és DeLeo 2009; Kirby 1944; Rammelkamp és Maxon 1942). A 20. században tehát az antibiotikumrezisztens baktériumok megjelenésére a válasz újabb antibiotikumok fejlesztése volt, figyelmen kívül hagyva az új antibiotikumok rezisztencia szempontjából történő jellemzését. Emellett, az antibiotikumok felelőtlen használata tovább súlyosbította az antibiotikumrezisztens baktériumok és az általuk hordozott antibiotikumrezisztencia-gének (ARG) elterjedését. Mindezen okokat figyelembe véve az antibiotikumrezisztens fertőzéseket célzó kutatások folytatása kritikus fontossággal bír. (Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017)

2.2 Szerzett antibiotikumrezisztencia mechanizmusok

Az antibiotikumrezisztencia-gének (ARG-k) elterjedésének monitorozása a rezisztenciakutatás egyik kulcseleme. A rezisztenciagének két fő úton kerülhetnek át más baktériumokba. Az egyik a vertikális evolúció, a másik pedig a horizontális evolúció eredménye (Durão, Balbontín, és Gordo 2018; Sommer és mtsai. 2017).

A vertikális evolúció egy normál öröklődési folyamatnak felel meg, mely során a gének a szülőről utódra öröklődnek, így az előnyt jelentő tulajdonság aránya generációról generációra nő. Az ARG-k horizontális géntranszfer útján történő elterjedése során egy antibiotikumokra rezisztens donor baktériumtól az antibiotikumra érzékeny recipiens baktérium rezisztencia gén(ek)re tesz szert (Durão, Balbontín, és Gordo 2018; Sommer és mtsai. 2017).

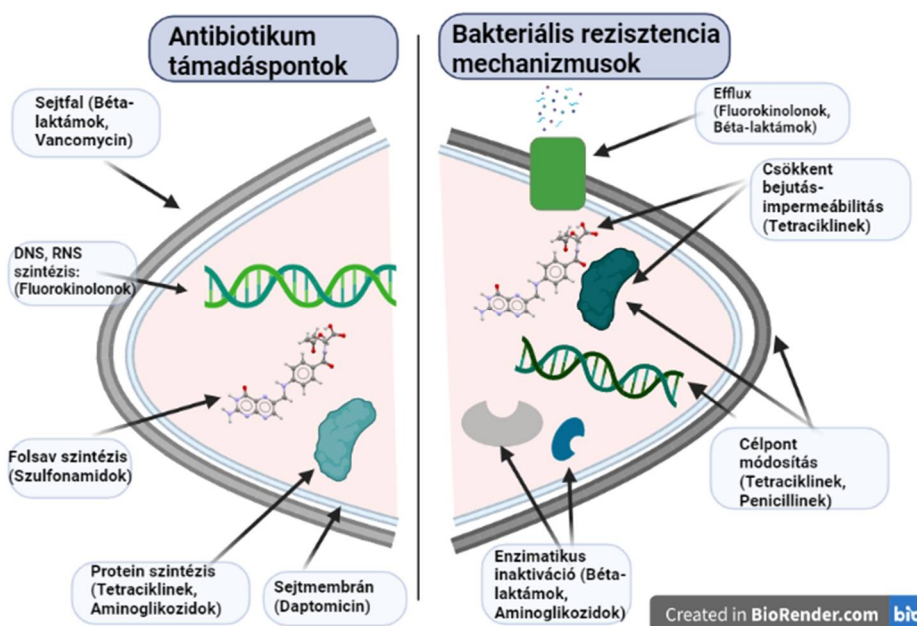
A horizontális géntranszfer (HGT) három fő módon valósulhat meg: természetes vagy mesterséges úton történő transzformációval (1), bakteriális vírusok (bakteriofágok) segítségével történő transzdukcióval (2) és konjugációval (3) (1. ábra) (Durão, Balbontín, és Gordo 2018; Sommer és mtsai. 2017).



1. ábra A horizontális géntranszfer főbb formái (BioRender programmal készítve; Durão, Balbontín, és Gordo 2018)

Az ábra a horizontális géntranszfer három fő módját foglalja össze 1: Transzformáció, 2: Transzdukció bakteriális vírusok segítségével, 3: Konjugáció

A HGT útján szerzett rezisztencia mechanizmusok sokfélék lehetnek, többek között: az intracelluláris antibiotikum koncentráció csökkentése, az antibiotikum célpontjának módosítása vagy antibiotikum inaktiváció hidrolízissel vagy különféle módosításokkal. A 2. ábra a bakteriális sejtben az antibiotikumok gyakori támadáspontjait és a baktérium által válaszként kialakított rezisztencia mechanizmusokat foglalja össze (Blair és mtsai. 2015).



2. ábra Antibiotikumok gyakori támadáspontjai a baktériumban, illetve az ezekkel szemben kialakuló bakteriális rezisztencia mechanizmusok (BioRender programmal készített ábra.; Blair és mtsai. 2015; módosított ábra: Max 2018 alapján)

A 2.ábra bal oldalán az antibiotikumok főbb támadáspontjai láthatóak. Az ábra jobb oldala a baktériumok válaszméchanizmusait foglalja össze. Zárójelben a bal oldalon, olyan antibiotikumok kerültek felsorolásra, amelyek az adott bakteriális struktúrát, folyamatot támadják. Zárójelben a jobb oldalon, azok az antibiotikumok vannak, amelyekkel szemben az adott rezisztencia mechanizmus előfordul.

Hatásuk alapján az antibiotikumok sokféleképpen csoportosíthatók (2. ábra): gátolhatják a fehérjeszintézist (tetraciklinek, aminoglikozidok) vagy a DNS vagy RNS szintézist (topoizomeráz gátlók: kinolonok), a folsav szintézist (szulfonamidok) vagy léteznek magát a sejtfalszintézist gátlók (β -laktám antibiotikumok: cefalosporinok, karbapenemek) (Blair és mtsai. 2015; Max 2018).

A baktériumok pedig az antibiotikumok okozta szelekciós nyomásra eltérő védekezési mechanizmusokat „fejlesztettek ki”, melyek különféle strukturális különbségekkel is kiegészülhetnek. A strukturális különbségekből adódóan, mint például a Gram-negatív baktériumok sajátos külső és belső membránból álló sejtfalszerkezete eredményeképp a Gram-negatívokban és a Gram-pozitívokban a védekezési mechanizmusok eltérhetnek. Az antibiotikumok bejutása a sejtbe a Gram-negatív baktériumok esetén a sejtfal külső membránján lévő porin csatornákon keresztül valósulhat meg. A baktérium ezért annak érdekében, hogy csökkentse a bejutó antibiotikum mennyiséget képes a porin csatornák struktúráját megváltoztatni, illetve a porin fehérje expressziót csökkenteni. Egy másik lehetséges mód az intracelluláris antibiotikum koncentráció csökkentésére a sejtfelszínen lévő efflux pumpákhoz köthető. Az efflux pumpák aktívan képesek kijuttatni a sejtől a bejutott

antibiotikumokat. Az előbbi két mechanizmus gyakran társul enzimatikus folyamatokkal. Ezen enzimatikus folyamatokra lehet jó példa a béta-laktám antibiotikumokkal szemben termelődő béta-laktamáz enzimek. (Blair és mtsai. 2015; Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017)

Önmagában azonban a fent említett rezisztencia mechanizmusok ismerete, még nem elég ahhoz, hogy felvegyük a harcot a rezisztens kórokozókkal. A különböző környezetekben előforduló funkcionális ARG-k azonosítása kritikus a megfelelő antibiotikum fejlesztéshez (Blair és mtsai. 2015; Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017).

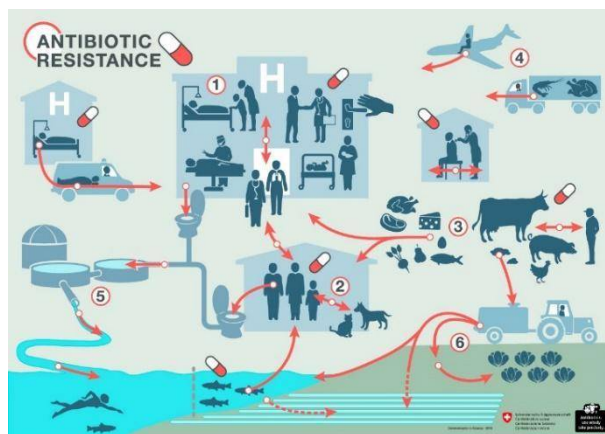
2.3 Az antibiotikumrezisztencia kutatás új módszere: a funkcionális metagenomika

Az antibiotikumrezisztencia kutatás hajnalán a rezisztenciáért felelős gének azonosítása egyesével történt egyetlen baktériumtörzset vizsgálva. Ezt követően a szekvenálás fejlődése eredményeképp lehetővé vált, hogy a vizsgált környezetek összes rezisztenciagénjét (az ún. rezisztómákat) azonosítsák metagenomikai módszerek segítségével (Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017). Metagenomnak nevezzük a különféle környezetekből izolált mikrobák genetikai állományának összességét (Basak, Biswas, és Bhattacharyya 2020). A metagenomika pedig egy olyan módszer, amellyel egy adott környezetben élő mikrobiális közösségek feltérképezhetők egy adott tulajdonságra nézve anélkül, hogy a mikrobiális közösség minden tagját külön-külön szaporítanánk. Ez a vizsgált tulajdonság lehet például az ARG-k jelenléte. (Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017; dos Santos és mtsai. 2017)

A metagenomika egyik fő hiányossága azonban az, hogy a széles spektrumban azonosított ARG-k nem nyertek funkcionális megerősítést. Ez azt jelenti, hogy a szekvenálások során azonosított ARG-k, nem feltétlen funkcionálnak rezisztencia determinánsként egy adott baktériumban. Ezen gének validálását a funkcionális metagenomika tette lehetővé. A funkcionális metagenomika egy olyan nagy-áteresztőképességű módszer, amellyel a környezetben lévő metagenomok egy adott funkcióra nézve térképezhetők anélkül, hogy a mikrobiális közösség minden tagját külön-külön szaporítanánk. (Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017; dos Santos és mtsai. 2017; Sommer és mtsai. 2017)

Az antibiotikumrezisztencia kutatás során az ARG-könyvtárak létrehozásához jó alapanyagul szolgálhatnak olyan területekről származó metagenomok, ahol az antibiotikumok nagymértékben kerülnek felhasználásra. Az ilyen területeken rengeteg ARG lehet jelen az antibiotikumok okozta magas szelekciós nyomás eredményeként. Ezeket a területeket

rezisztencia forrópontoknak nevezzük (Gwenzi, Musiyiwa, és Mangori 2020; Kunhikannan és mtsai. 2021). Ilyen forrópontok lehetnek a kórházak (1), a mezőgazdasági területek (6,3), a szennyvíztározók (5), iparosodott területek (6), de akár a háztartások is (2) (3. ábra) (Federal Office of Health: How does antibiotic resistance spread? online forrás).



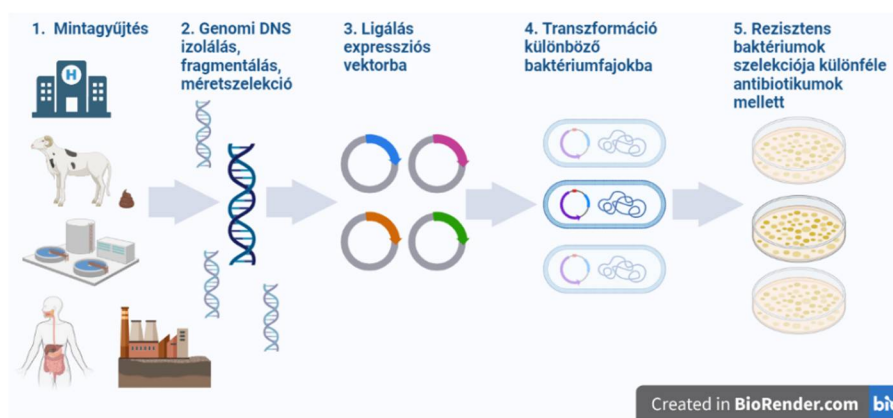
3. ábra Antibiotikumrezisztencia forrópontok (Federal Office of Public Health: How does antibiotic resistance spread? online forrás)

Az ábrán a főbb antibiotikumrezisztencia forrópontok láthatóak a környezetben számokkal jelölve 1: kórházak, 2: háztartások, 3: élelmiszerek, 4: szállítás, 5: szennyvíztározók, 6: mezőgazdasági területek, iparosodott területek talaja. A nyilak a lehetséges génátvitel (antibiotikumrezisztencia-gén cseréket) jelzik az egyes baktériumok között.

Az antibiotikumrezisztencia kutatás egyik fő célja a rezisztencia forrópontok és az ott cirkuláló rezisztenciagének azonosítása és e tudás felhasználása a gyógyszergyártási folyamatok során. Ehhez kiváló módszert jelent a funkcionális metagenomika (Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017).

A fejlesztés alatt álló antibiotikumok szempontjából kiemelt fontosságú a különböző környezetekben potenciálisan már jelenlévő és cirkuláló rezisztenciagének feltérképezése hisz, ha a rezisztenciagén(ek) már jelen vannak a környezetben, az antibiotikum rövid időn belül hatását fogja veszteni és a klinikumban való alkalmazhatósága megkérdőjeleződik. Ehhez kiváló nagy-áteresztőképességű módszer a funkcionális metagenomika, amely lehetővé teszi, hogy egy adott környezetből származó metagenom DNS-ből olyan géneket azonosítsunk, melyek egy heterológ gazdában kifejezve egy általunk vizsgált, molekuláris funkciót látnak el. Ez a 2000-es években leírt technika lehetővé teszi például olyan funkcionális ARG-k azonosítását, amelyek horizontális géntranszferrel más baktériumokba is átkerülhetnek és működőképesek lehetnek az új gazdában is. A funkcionális metagenomika segítségével laboratóriumi körülmények között modellezhető a baktériumok közötti génátvitel és ezáltal az ARG-k átjutása más, potenciálisan kórokozó baktériumokba. (Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017; dos Santos és mtsai. 2017; Sommer és mtsai. 2017)

Az ARG-k azonosítása során a módszer fő lépései a következők: Elsőként a különféle környezetekből (rezisztencia forráspontokról) történő mintavétel történik. Ezt követi a mintákból történő metagenom DNS izolálása, fragmentálása és ezen fragmentumok méretszelekciója. Harmadik lépésként a méret alapján elválasztott fragmentumokat expressziós vektorba ligálják, amely lehetővé teszi a heterológ gazdában történő expressziót. A metagenom DNS fragmentumokat hordozó vektor könyvtárat pedig transzformálással juttatják be a vizsgálni kívánt gazdába. Utolsó lépésként a vizsgálni kívánt funkcióra szűrnek. Ez esetben különféle antibiotikumok jelenlétében szelektálják a rezisztens kolóniákat. A funkcionális ARG-k azonosítása pedig szekvenálással történik (4. ábra) (Apjok és mtsai (publikálás alatt). 2022; Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017; dos Santos és mtsai. 2017; Sommer és mtsai. 2017).



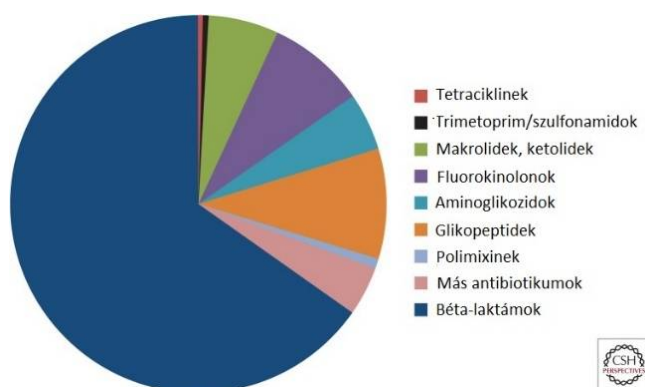
4. ábra Funkcionális metagenomikai munkafolyamat (BioRender programmal készített ábra)

Az ábra a funkcionális metagenomikai munkafolyamat főbb lépéseit mutatja számokkal. Az első a mintagyűjtés különféle környezetekből, a második a genomi DNS izolálása, fragmentáció és méretszelekció, a harmadik az expressziós vektorba történő ligálás, a negyedik a transzformáció különböző baktériumfajokba, az ötödik pedig a rezisztens baktériumok szelekciója különféle antibiotikumok mellett.

2.4 A β -laktám antibiotikumok

A 2.3 pontban említett funkcionális metagenomikai munkafolyamat során a szelekcióra használhatunk például β -laktám antibiotikumokat. Ezek közé az antibiotikumok közé tartoznak a penicillin származékok, cefalosporinok, monobaktámok, karbapenemek, cephamicinek. A β -laktámok olyan baktericid antibiotikumok, amelyek a baktériumokban a sejtfallszintézist gátolják, hasonlóan az elsőként felfedezett antibiotikumhoz, a penicillinhez (Blair és mtsai. 2015; Bush és Bradford 2016, 2019). A baktericid antibiotikumok a baktériumok pusztulását okozzák, míg a bakteriosztatikusok csak a baktériumok szaporodását gátolják (tetraciklinek). (Antibiotic Classification & Mechanism - Basic Science - Orthobullets; Pankey és Sabath 2004) Elmondható, hogy a β -laktám antibiotikumok a leggyakrabban alkalmazott antibiotikumok közé tartoznak napjainkban. (Bush és Bradford 2016)

A β -laktám antibiotikumok népszerűségébe az 5. ábra enged betekintést, mely megmutatja, hogy milyen arányban javallottak a β -laktám antibiotikumok orvosi kezelés folyamán napjainkban. Jól látható, hogy a javallatok 65%-át a β -laktám antibiotikumok teszik ki (Bush és Bradford 2016). Ez a népszerűség viszont számos árnyoldallal rendelkezik, hiszen a fokozott használat az ARG-k széles repertoárjának megjelenését eredményezi, illetve ezek széles körű elterjedését (Bush és Bradford 2019; Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017). A β -laktámokkal szemben elterjedő ARG-k a β -laktamázok, melyek enzimatis úton hasítják az antibiotikumokat (Blair és mtsai. 2015).

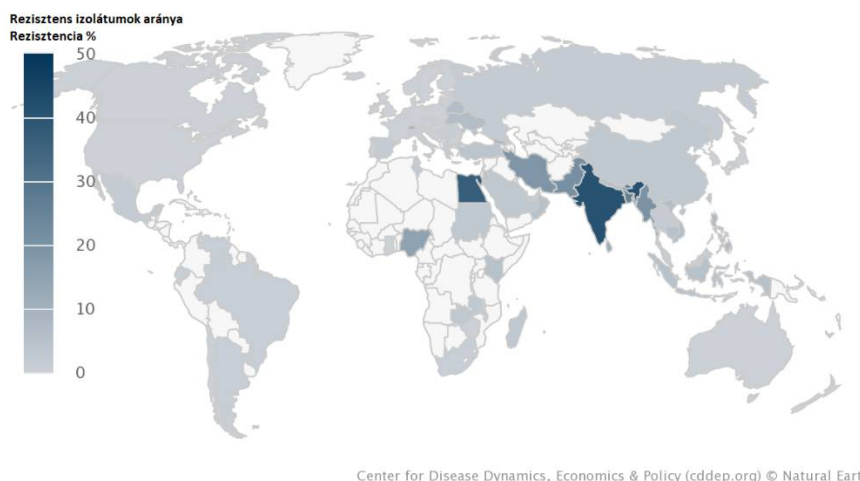


5. ábra Javallott antibiotikumok aránya az orvoslásban (Bush és Bradford 2016)- alapján módosított ábra

Az 5. ábrán látható kördiagrammon a felsorolt antibiotikumok felhasználási aránya látható az orvoslásban színkóddal ellátva. Mint látható a β -laktámok a javallatok 65%-át teszik ki. A kördiagrammon színkódolt antibiotikumok a következők: sötét kék: β -laktámok; sötét rózsaszín: tetraciklinek; fekete: trimetoprim/szulfonamidok; zöld: makrolidek, ketolidek; lila: fluorokinolonok; türkiz: aminoglikozidok; narancs: glikopeptidek; világos kék: polimixinek; rózsaszín: más antibiotikumok.

A 6. ábra a harmadik generációs cephalosporinokkal szemben rezisztens *Escherichia coli* (*E. coli*) előfordulását mutatja a világon (ResistanceMap - Antibiotic Resistance honlap). A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia Európában, Ázsiában és Amerikában is igen gyakori. Ázsia egyes területein, mint Indiában akár 80% körül is lehet a cephalosporinokkal szemben rezisztens *E. coli* aránya. Az azonosított rezisztens izolátumok aránya viszont nem minden esetben tükröz valós adatokat. Ennek fő oka, az egyes országokban eltérő életkörülmények és gazdasági viszonyok és az adatszolgáltatás hiánya vagy korlátozottsága. (Elder, Kuentz, és Holm 2016; ResistanceMap - Antibiotic Resistance honlap)

Cephalosporinokkal szemben rezisztens *Escherichia coli* aránya világviszonylatban



6. ábra A cephalosporinok 3. generációjával szemben rezisztens *Escherichia coli* előfordulási aránya (ResistanceMap - Antibiotic Resistance honlapról származó ábra.)

Az ábra a cephalosporinok 3. generációjával szemben rezisztens *Escherichia coli* előfordulási arányát mutatja a világon. A bal oldali 0-tól 50%-ig terjedő szinkóddal ellátott skála a rezisztens izolátumok arányát mutatja rezisztencia %-ban. Az erősebb sötétkék szín a nagyobb rezisztencia %-ot jelöli, az ilyen színnel jelölt területeken nagyobb arányban azonosítottak rezisztens baktériumokat. A fehér szín azokat a területeket jelzi, ahol nem azonosítottak harmadik generációs cephalosporinokkal szemben rezisztens *E. coli*-t.

2.5 A β -laktám antibiotikumok hatásmechanizmusa:

A β -laktám antibiotikumok a baktériumok sejtfallszintézisét és ezáltal a növekedését gátolják. A sejtfallszintézis során a transzpeptidáz reakció gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat. A transzpeptidáz reakciót végrehajtó fehérjék az ún. penicillin-kötő fehérjék (angolul: **Penicillin-binding proteins- PBP**). A β -laktámok hatása abból ered, hogy a PBP egy hiba eredményeként a β -laktámot fogja szubsztrátként felhasználni, így a PBP katalitikus centrumát irreverzibilisen acilálja az antibiotikum, funkcióképtelen sejtfallat eredményezve. Ezáltal a funkcióképtelen sejtfallal nem fogja tudni fenntartani a baktérium alakját és a sejt ozmotikus tulajdonságai megváltoznak. A baktérium lízisét pedig az okozza, hogy a bakteriális autolitikus enzimek a sejtfallösszetevőket lebontják, sérül a peptidoglikán és a murein, így a permeabilitás megnő. Az irreverzibilis módosulás után a PBP hidrolizálódik, közben a β -laktám inaktíválódik a reakció végére. (Bonomo 2017; Bush és Bradford 2019)

2.6 A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mechanizmusai:

A β -laktámokkal szemben igen hamar megjelentek az ARG-k, amelyek a β -laktamázokat kódolják. A β -laktamázok 4 féle módon képesek a β -laktámokkal szemben fellépni (Bonomo 2017). Az első mechanizmus lényege, hogy a PBP fehérjék módosulnak és ezen módosulás

eredményeképpen kisebb affinitással kötődnek a β -laktám antibiotikumhoz. A második mechanizmus is a PBP fehérjét érinti, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a belső membránban lévő PBP-k hozzáférhetősége változik meg. Ezen PBP-khez a β -laktám porin csatornákon keresztül jut és ha ezen porin csatornák módosulnak a membrán permeabilitása megváltozik az antibiotikumra és rezisztencia alakulhat ki. Erre lehet példa egyes porinok (OprD) teljes hiánya vagy csökkent mennyisége, melynek eredményeképpen rezisztencia alakul ki a karbapenemekkel szemben (Bonomo 2017; Papp-Wallace és mtsai. 2011). A harmadik mechanizmus az efflux pumpák (például: *mex*) működésén alapul, gyakran kiegészülve más rezisztencia mechanizmusokkal, többek között hidrolitikus folyamatokkal. A hidrolitikus folyamatok lényege, hogy a vízaddíciót felgyorsítva inaktíválják a β -laktám antibiotikumot, így az képtelen lesz a PBP működésének gátlására (Blair és mtsai. 2015; Bonomo 2017; Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017). A β -laktamázok aktív centrumukban gyakran tartalmaznak szerint (szerin β -laktamázok) vagy cinket (metallo- β -laktamázok (MBL)) (Bush és Bradford 2019).

2.7 A β -laktamázok karakterizálása:

A β -laktamázok karakterizálása során figyelembe kell venni, hogy szerin β -laktamázzal vagy metallo- β -laktamázzal (MBL) van-e szó. Karakterizálásuknál két fő irányelv terjedt el az Ambler féle és a Bush-Jacoby-Medeiros csoportosítás. Az Ambler féle karakterizálás 4 különféle molekuláris osztályt hoz létre és ezeket A, B, C és D betűvel jelöli. Az A, C és D csoportok mind szerin β -laktamázok, a B csoport tagjai viszont a Zn^{2+} iont tartalmazó MBL-k közé sorolhatóak. A Bush-Jacoby-Medeiros karakterizálás funkcionálisan különíti el a β -laktamázokat alapul véve azok aminosavszerkezetét is. A csoportosítási mód továbbá figyelembe veszi a hidrolitikus profilt és a különféle inhibitorokkal szembeni választ. Ez a csoportosítás három főcsoportot (1,2,3) és különböző betűkkel jelölt alcsoportokat különít el. (Bonomo 2017; Bush és Bradford 2019)

A szerin β -laktamázok közé tartozhatnak a plazmidokon és kromoszómálisan is előforduló Ambler A és C csoportba tartozó β -laktamázok (Ambler A: *TEM-1*, *SHV-1*, *ESBL- extended spectrum beta-lactamase*, Ambler C: *CMY*). Továbbá az Ambler A és C csoporttól szekvenciálisan igen eltérő szerin β -laktamázok a D csoportba tartozó oxacillin hidrolizáló β -laktamázok (OXA). (Bonomo 2017; Bush és Bradford 2019)

A MBL-ek az Ambler osztályozás szerint a B osztályba tartoznak. A B osztályba tartozó β -laktamázok a legtöbb β -laktámot és karbapenemet hidrolizálni képesek, kivéve a

monobaktámokat, amelyek közé tartozik például az aztreonam is. Bár bizonyos kelátoló ágensek, mint például az EDTA képesek gátolni az MBL-eket, jelenleg nincs olyan FDA által jóváhagyott inhibitor, amelyről ugyanez elmondható (Bonomo 2017; Bush és Bradford 2019). Néhány ígéretes inhibitor viszont fejlesztés alatt áll, melyek hatásosak lehetnek ezen β -laktamázokkal szemben (xeruborbaktám, taniborbaktám) (2021 *antibacterial agents in clinical and preclinical development WHO-jelentés*). A probléma másik oldalát az jelenti, hogy ezek az ARG-k gyakran plazmidokon kódoltak, így könnyen terjedhetnek el a környezetben horizontális géntranszfer útján. Ilyen β -laktamázok lehetnek például az NDM-ek (New-Delhi Metallo- β -laktamázok). Számos Gram-negatív baktériumban előfordulnak többek között az *Enterobacteriaceae* különféle fajaiban, illetve *Acinetobacter*-ban és *Pseudomonas* fajokban. (Bush és Bradford 2019; Verma 2017; Wang és mtsai. 2014)

3 Célkitűzés

A β -laktám antibiotikumok a világon leggyakrabban és legrégebb óta alkalmazott antibiotikumok. Ennek következtében, az ellenük rezisztenciát biztosító béta-laktamázok repertoárja igen széles, amelyeket a baktériumok horizontális géntranszferrel adnak át egymásnak (Bush és Bradford 2019; Sommer és mtsai. 2017; Vaidya 2011).

Munkám célja, hogy vizsgáljam, a horizontális géntranszferrel megvalósuló rezisztencia-evolúciót klinikailag releváns kórokozókban. Ehhez, funkcionális metagenomikai szűrést alkalmazok többféle környezeti mintából készült metagenomikai és genomi könyvtárakon *E. coli*-ban. A könyvtárak létrehozásához használt minták olyan területekről származnak, amelyek rezisztenciagén forráspontoknak tekinthetők (állattenyésztés, szennyvíz, valamint patogén baktériumok genomja). A funkcionális szűrés során célozom, a β -laktamáz enzimek azonosítása ezekben a környezetekben, majd a későbbiekben annak tesztelése, hogy melyek azok a β -laktamáz inhibitorok, amelyeket az antibiotikumokkal együtt alkalmazva helyreállítják az antibiotikumok hatékonyságát.

Ezek az eredmények hozzájárulhatnak ahhoz, hogy javaslatokat tegyünk, arra vonatkozóan, hogy a környezetben cirkuláló β -laktamázokkal szemben melyek azok az antibiotikum és β -laktamáz inhibitor kombinációk, amelyek jól alkalmazhatók rezisztens bakteriális fertőzések kezelésére.

4 Anyagok, eszközök és módszerek:

4.1 Mintagyűjtés

A metagenomikai könyvtáráépítés első lépése a különböző környezetekből történő mintagyűjtés, majd ezekből a környezeti mintákból genomi DNS izolálás, fragmentálás, majd a DNS fragmentumok méret alapján történő szétválasztása. A megfelelő méretű fragmenteket egy alacsony kópiaszámú plazmidba ligáljuk és célfajba juttatjuk (*Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017; dos Santos és mtsai. 2017*).

Munkám egy nagyobb vizsgálat részét képezte (*Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt)*), ahol a felhasznált minták összegyűjtése antibiotikumrezisztencia forráspontokról történt. Ilyen területek a kórházak, az iparosodott területek talaja, a szennyvíztározók, a mezőgazdaság és az emberi bélflóra. A létrehozott könyvtárakat figyelembe véve 4 főkönyvtár különíthető el: a klinikai könyvtár, a bél mikrobiom könyvtár, a szennyvíz könyvtár és az indiai talajmintákból származó talajkönyvtár.

A klinikai könyvtárhoz antibiotikum rezisztens és MDR (multidrog-rezisztens), azaz egynél több antibiotikumra rezisztens baktérium törzsek genomjait használtuk (*Magiorakos és mtsai. 2012*). Ennek során egy korábban készített, 68 bakteriális genomból álló könyvtárat 123 újabb genommal kiegészítve, összesen 191 bakteriális genomból készítettünk genomi könyvtárat (*Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt)*).

A szennyvízkönyvtár létrehozásához szükséges szennyvízminták Magyarországról (Budapest, Békéscsaba, Szeged, Debrecen, Kecskemét, Hódmezővásárhely) és Romániából (Kézdivásárhely) származnak.

A bél mikrobiom könyvtár állati és emberi eredetű ürülék mintákból épül fel. Az állati bél mikrobiom minták egyrészt magyarországi másrészt szerbiai állattenyésztő telepekről származó állati ürülekből állnak (sertés, marha és bárány). Az emberi bél mikrobiom minták pedig 10 olyan európai embertől származtak, akik nem álltak antibiotikum kezelés alatt a mintaadást megelőző egy évben (*Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt)*).

A talaj könyvtárhoz a minták India erősen iparosodott területeiről származnak (*Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt)*). A fent említett könyvtárak közül én hoztam létre az állati bél mikrobiom és szennyvíz alkönyvtárakat, valamint én bővítettem ki a klinikai könyvtárat. A többi könyvtárat munkatársaim készítették.

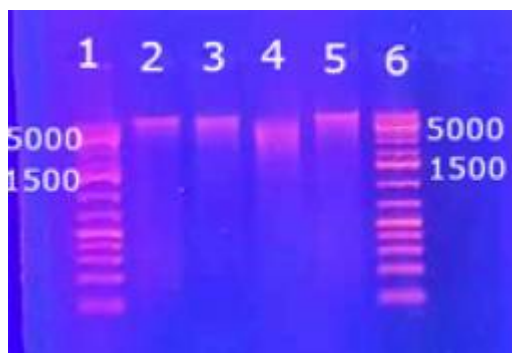
4.2 Metagenomi és genomi DNS izolálás környezeti mintákból és klinikai izolátumokból

A környezeti mintákból történő DNS izoláláshoz a **Qiagen Dneasy Powersoil Pro** (*Qiagen*) kitet használtam. Több kitet összehasonlítva, mennyiségileg (koncentráció) és minőségileg (alacsony fragmentáltság) ezzel a kittel lehetett a legjobb eredményeket elérni. A DNS izolálás a kithoz tartozó protokoll alapján történt - azzal a módosítással, hogy mintánként minimum 500 mg környezeti mintát használtam fel a kiindulásnál.

A klinikai izolátumokból történő genomi DNS preparálás a **Sigma GeneElute Bacterial Genomic DNA Kit** (*Sigma*) kittel történt – a kithoz tartozó protokoll utasításait követve.

Az izolált DNS mintákat fragmentáltság szempontjából agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (7. ábra) A cél az, hogy minél alacsonyabb legyen a DNS fragmentáltsága az izolálást követően.

A 7. ábra látható agaróz gélelektroforézis kép 4 mezőgazdasági mintából izolált DNS fragmentáltságát mutatja. Látható, hogy a negyedik sávban lévő minta fragmentáltabb, így ezt nem használtuk fel a későbbiekben. A másik három DNS minta (2,3,5) jól definiált sávot mutat, így alkalmassá tette ezeket a mintákat próbaemésztés végrehajtására. Az agaróz gélelektroforézishez 1 kbp Plus DNS molekulasúly markert alkalmaztam (*Thermo Fisher Scientific*) és minden izolált DNS mintából 100 ng-ot futtattam, GelRed (*Biotium*) interkalálódó nukleinsav festéket alkalmazva. Az izolált DNS mintákhoz 6x-os hígításban Loading dye (*Thermo Fisher Scientific*) festék került hozzáadásra. Ennek célja, hogy a DNS minták haladása a gélfuttatás során, nyomon követhető legyen. A gélfuttatás 120 V-on történt 25 percig, 1%-os agaróz gélen. Az izolált DNS koncentrációját **Qubit fluoriméter** segítségével határoztuk meg a készülék használatához tartozó protokollt követve.



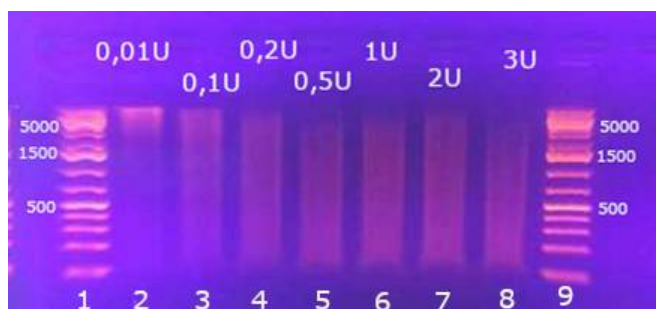
7. ábra Fragmentáltság ellenőrzés agaróz gélelektroforézissel

A gélképen az első és a hatodik sávban a 1 kbp Plus DNS molekulásúly marker (Thermo Fisher Scientific) látható. Számokkal jelölve az 2, 3, 4, 5 sávban láthatóak a mezőgazdasági mintákból izolált DNS minták. A 2, 3, 5 sávban lévő izolált DNS minták nem fragmentáltak, viszont a 4. sávban lévő minta fragmentált, így azt nem használtuk a továbbiakban.

4.3 A genomi és metagenomi DNS fragmentálása MluCI restrikciós enzimmel

Az izolált DNS fragmentálása MluCI (New England Biolabs- NEB) restrikciós enzimmel történt, melynek koncentrációja 10 U/μl. Egy próbaemésztés során először megállapítottuk azt az enzimmennyiséget, amellyel megfelelő méretű fragmentek érhetőek el. Esetünkben ez az 1,5 kbp-5 kbp mérettartomány. Az izolált genomi DNS-ből reakciónként 1000 ng-ot emésztettünk meg különböző enzimkoncentrációkkal (0,01 U; 0,1 U; 0,2 U; 0,5 U; 1 U; 2 U; 3 U; 4 U; 5 U). Az MluCI működéséhez szükséges Smart-Cut puffert (New England Biolabs- NEB) 10x-es hígításban alkalmaztuk, ez például 100 μl végtérfogat esetén 10 μl puffert jelent. Az emésztést 10 percig 37 °C-on végeztük. Ezt egy hőinaktivációs lépés követte 20 percig 80 °C-on. Ez utóbbi lépéssel az enzimet inaktiváltuk. Ezt követően agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőrizzük az emésztést. A gélfuttatás 1 kbp Plus DNS molekulásúly marker (Thermo Fisher Scientific) mellett történt, 120 V-on 25 percig, 1 %-os agaróz gélen. Az emésztett mintákból 50-50 ng-ot futtatunk meg a gélen, GelRed (Biotium) interkalálódó nukleinsav festéket alkalmazva.

A 8. ábra látható gélképen különböző koncentrációjú (0,01 U; 0,1 U; 0,2 U; 0,5 U; 1 U; 2 U; 3 U; 4 U; 5 U) MluCI enzimmel emésztett DNS minták láthatóak. Ideálisnak, a 4.sávban látható 0,2 U-os emésztés mondható, így ezzel az enzimkoncentrációval végeztük az emésztést a továbbiakban (8. ábra). A 0,2 U-os enzimkoncentráció esetén nagy mennyiségű 1500 és 5000 bp mérettartományú fragmens érhető el és a minta nem túlemésztett.



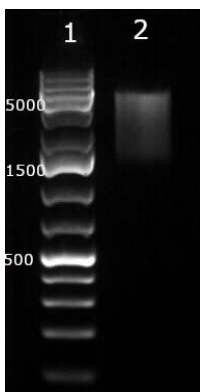
8. ábra Próbaemésztés MluCI enzimmel

A 8. ábrán egy mezőgazdasági minta próbaemésztése látható MluCI enzimmel. Az első és a kilencedik sávban az 1 kbp plus DNS molekulásúly marker (Thermo Fisher Scientific) látható, a fragmentált mintákból 50-50 ng-ot futtattunk meg a gélen. A 2.sávtól a nyolcadik sávig látható a mezőgazdasági mintákból izolált DNS minták próbaemésztése során alkalmazott emelkedő enzimkoncentráció (0,01 U; 0,1 U; 0,2 U; 0,3 U; 0,5 U; 1 U; 2 U; 3 U). Ideálisnak a 4.sávban látható 0,2 U-os enzimkoncentráció mondható, hiszen ebben az esetben nagy mennyiségű 1500 és 5000 bp mérettartományú fragmens érhető el és nem tekinthető túlemésztettnek sem a minta.

Miután megtaláltuk a megfelelő enzimkoncentrációt, az izolált metagenomi és genomi DNS-ből általában 30-40 µg-ot emésztettünk meg. Az volt a célunk, hogy az emésztést követően nagyjából 10-15 µg emésztett DNS maradjon, hogy megfelelő mennyiségű DNS-el kezdhesük meg a méretszelekciót. Az emésztés eredményét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az emésztett DNS mintát **DNA Clean & Concentrator** (Zymo) kittel tisztítottuk a szennyeződésektől a méretszelekció előtt és ismét DNS koncentrációt mértünk.

4.4 Az emésztett minták méretszelekciója

Az emésztés segítségével fragmentált mintákat méret szerint elválasztottuk és izoláltuk a **BluePippin DNA Size Selection System** (Sage Science) készülék segítségével. A méretszelekció során az 1,5- 5 kbp mérettartományba eső DNS fragmenseket választottuk el a más méretű fragmensektől. Az elválasztáshoz a gyártó által forgalmazott 0,75%-os agarózt tartalmazó külső markeres gélkazettát és a “Low Voltage 1-6 kb Marker S1” kazetta definíciót használtunk, céltartománynak pedig az 1 és 5 kbp közötti régiót adtuk meg, mivel ez a beállítás bizonyult megfelelőnek a 1,5 kbp-os alsó határ eléréséhez. Utólagosan agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük a megfelelő szelekciót, 50-50 ng-ot futtatva minden mintából, GelRed (Biotium) interkalálódó nukleinsav festéket alkalmazva (9. ábra). A futtatás 1 kbp Plus molekulasúly marker (Thermo Fisher Scientific) mellett történt, 110 V-on 35 percig, 1%-os agaróz gélen. A méretszelektált DNS minták haladásának követését a gélben a mintákhoz adagolt 6x-os hígításban alkalmazott Loading dye (Thermo Fisher Scientific) biztosítja. Ezt követően tisztítottuk a mintákat a **DNA Clean & Concentrator** (Zymo) kittel, majd megmértük a méretszelektált DNS koncentrációját.

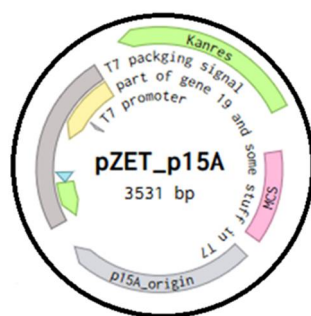


9. ábra Méretszelekció ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel

A BluePippin DNA Size Selection System (Sage Science) készülék segítségével méretszelektált metagenomi DNS-t agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük. A méretszelekció során az 1,5-5 kbp tartományba eső DNS fragmensekre szelektáltunk. Az első sávban az 1 kbp Plus DNS létra (Thermo Fisher Scientific) látható, majd a második sávban a méretszelektált DNS látható. Az emésztett, méretszelektált DNS minta az 1500 és 5000 bp mérettartomány között volt, így a méretszelekció sikeres volt.

4.5 pZE21-p15A plazmid előkészítése klónozáshoz:

A klónozáshoz az alacsony kópiaszámú pZE21-p15A plazmidot (10. ábra) szaporítottuk fel. Ez a plazmid tartalmaz egy kanamicin rezisztencia gént, egy multiklónozó régiót, egy p15A replikációs origót és egy T7 csomagoló szignált. Ez a csomagoló szignál lehetővé teszi, hogy a plazmidot a hagyományos elektroporálás mellett bakteriofág közvetített transzdukcióval is bejuttathassuk különböző fajokba például *Klebsiella pneumoniae*-ba, *Shigella sonnei*-be vagy pedig *Salmonella enterica*-ba (Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt)). A plazmid mérete 3,5 kbp. Az 1,5-5 kbp fragmentumok beépítése után egy viszonylag nagy méretű plazmidot kapunk.



10. ábra pZE21_p15A plazmid felépítése (Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt))

A pZE_p15A plazmid 3531 bp nagyságú plazmid, amely kanamicin rezisztencia génnel rendelkezik (Kanres). Továbbá a plazmidon még látható egy p15A replikációs origó (p15A origin), egy multiklónozó régiót (MCS). Emellett tartalmaz egy T7 csomagoló szignált (T7 packaging signal) és egy T7 promótert, amely az egyes patogén fajokba (*K. pneumoniae*, *S. sonnei*, *S. enterica*) transzdukcióval történő bejuttatást teszi lehetővé.

A plazmid előkészítése a klónozáshoz a plazmid PCR amplifikációjával kezdődött, mely során olyan forward és reverz primerek kombinációját alkalmaztuk, amelyek véletlenszerű nukleotidösszetételű 10-10 nukleotid hosszú barcode-okat tartalmaznak. Ezek a barcode-ok az *Anyagok, Eszközök és Módszerek 4.11 alfejezetében* említett hibrid szekvenálás kivitelezéséhez szükségesek. A primerek hibridizációja 60 °C-on történt, az elongáció 72 °C-on 1'45'', 30 cikluson keresztül. Ezt a felamplifikált plazmidot 0,75 %-os agaróz gélen 90-100 V-on 2-3 órán át futtattuk, majd izoláltuk a **Monarch DNA Gel Extraction Kittel** (NEB) a kithez tartozó protokoll alapján. Ezt követően **DNA Clean & Concentrator** kittel (Zymo) tisztítottuk, majd megmértük a plazmid DNS koncentrációját.

A gélből izolált és tisztított plazmidot **Eco-RI** (Thermo Fisher Scientific) restrikciós enzimmel emésztettük, amely olyan hasítóhelyeket hoz létre, amelyek kompatibilisek az inszertek emésztéséhez használt **MluCI** (NEB) enzim által létrehozott ragadós végekkel. Az emésztés során 1000 ng DNS-hez 6 µl enzimet és Fast Digest (Thermo Fisher Scientific) puffert adtunk. Az emésztés 50 percig tartott 37 °C-on, majd ezt követi 5 perc inaktiváció 80 °C-on. A mintát

ezután megtisztítottuk, majd koncentrációt mértünk. Ezt követően alkalikus foszfatázzal kezeltük a plazmidot, ahol 1000 ng DNS-hez 4 µl **FastAP** (*Thermo Fisher Scientific*) alkalikus foszfatázt és az enzimhez alkalmazható puffert adtunk. Az alkalikus foszfatáz eltávolítja a foszfát csoportokat a DNS végekről és ezáltal a plazmid önligálódásának esélye nagymértékben csökkenthető. Az alkalikus foszfatáz kezelés alatt a mintát 20 órán keresztül 37 °C inkubáltuk, majd 10 perces 75 °C-os inaktiválást követően **DNA Clean & Concentrator** kittel (*Zymo*) tisztítottuk a plazmid DNS-t és koncentrációt mértünk.

4.6 Ligálás és kompetens sejtbe juttatás:

A ligálás során az alacsony kópiaszámú pZE21-p15A plazmidba (vektor-[10. ábra](#)), juttattuk be a méretszelektált DNS fragmenseinket (inszert). Az inszert:vektor arány 5:1 volt. Ez az arány 100 ng inszerttel és 20 ng vektorral vagy pedig 300 ng inszerttel és 60 ng vektorral teljesült. A ligálási reakcióhoz **T4 DNS ligázt, Rapid Ligation Puffert** (*Thermo Fisher Scientific*) használtunk, a reakcióhoz feleslegben ATP-t is adtunk. 15 µl ligálási reakció összeállításához szükséges: 2,5 µl ATP a 100 mM-os ATP törzsoldatból; 3 µl Rapid ligation puffer; 1,5 µl T4 DNS ligáz az 5 U/µl-es T4 DNS ligáz törzsoldatból. A koncentráció függvényében hozzáadjuk a DNS fragmenst és a pZE21-p15A plazmidot, emellett a kívánt végtér fogat eléréséhez a reakcióhoz nukleáz mentes vizet adunk. Kontrollként felhasználható egy olyan reakció, amely az inszert helyett csupán nukleáz-mentes vizet tartalmaz. Ezzel kontrolláltuk a vektor önligálódásának arányát, a cél, hogy az önligálódás minél alacsonyabb legyen. A ligátumokat és a kontrollt egy éjszakán át 15 °C-on inkubáltuk, majd **DNA Clean & Concentrator** kittel (*Zymo*) tisztítottuk.

A ligátumot és a kontrollt elektrokompetens sejtbe (*E. coli* MegaX (*Invitrogen*) vagy *E. coli* 10G ELITE Electrocompetent Cells (*Lucigen*)) elektroporáltuk. Az elektroporálás során 50 µl elektrokompetens sejthez 3,5 µl tisztított ligátumot adtunk. Az elektroporáláshoz **Bio Rad Micropulser Electroporator** gép Ec1 programját használtuk, amely kifejezetten *E. coli*-hoz alkalmazható és 1 db 1,8 kV-os sokkot ad le a sejtek számára. Az elektroporáláshoz továbbá 0,1 cm-es elektroporáló küvettákat használtunk. Elektroporálást követően a sejtekhez adott Recovery Medium segítségével regeneráltuk a sejteket és rögtön 37 °C-os légtermosztátba helyeztük őket 1 órára. Inkubációt követően kanamicines (50 µg/ml koncentrációjú) lemezre szélesztettük az sejteket 1x-es, 10x-es és 100x-os hígításban. A kontroll lemezre 1x hígításban szélesztettük a kontroll mintával elektroporált sejteket. Egy éjszakán át tartó inkubációt követően az [1. egyenlet](#) szerint határozzuk meg a ligátum transzformálási hatékonyságát 1 ml-

re, melyet CFU/ml mértékegységben fejeztünk ki. A CFU/ml mértékegység az 1 ml-re vonatkoztatott kolónia képző egységet (angolul: colony forming unit) jelenti.

$$\text{kolóniaszám} * \text{hígítás mértéke} * \frac{\text{elektroporálás térfogata (1000 } \mu\text{l)}}{\text{lemezre szélesztett sejtterfogat (50 } \mu\text{l)}} = \text{transzformálási hatékonyság } \left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}}\right)$$

1. egyenlet A ligátum transzformálási hatékonyságának megállapításához szükséges egyenlet

A ligátum transzformálási hatékonysága (elektroporálás hatékonysága) több tag szorzatából adódik. Az egyik tag a lemezen leszámolt kolóniaszám, a másik a szélesztés során alkalmazott hígítás mértéke, a harmadik pedig az elektroporálás térfogatának és a lemezre szélesztett sejtterfogatnak a hányadosa. Ha ezt a három tagú szorzást elvégezzük, akkor megkapjuk a ligátum sejtbe juttatásához használt elektroporálás hatékonyságát, melyet CFU/ml-ben (1 ml-re vonatkoztatott kolónia képző egység (angolul: colony forming unit)) fejeztünk ki. Ha egyetlen elektroporálást végeztünk, az elektroporálás térfogata 1000 μl , a lemezre szélesztett sejtterfogat 50 μl volt.

Miután meghatároztuk a ligátum transzformálási hatékonyságát (CFU/ml-ben) a kontroll lemezen látható kolóniaszámot levonva határozható meg az önligálódás mentes végső hatékonyság. Ha az önligálódás mentes végső transzformálási hatékonyságot egy átlagos inszertmérettel (2 kbp) felszorozzuk, akkor megkapjuk a könyvtárméretet (bázispárban (bp) kifejezve). A kész metagenomikai könyvtárak méretét az *Eredmények és értékelésük: 5.1* alfejezete írja le.

A szélesztett sejteket összegyűjtöttük az egy éjszakán át inkubált 1x-es hígítású lemezekről, plazmid DNS-t izoláltunk belőlük. A plazmid DNS izoláláshoz **GeneJET Plasmid Miniprep Kit-et** (*Thermo Fisher Scientific*) használtunk, mely során az elúció 50 μl nukleáz-mentes vízben történt. Ezt követően az izolált plazmidot **DNA Clean & Concentrator** kittel (*Zymo*) tisztítottuk.

4.7 Metagenomikai és genomi könyvtárak *E. coli* BW25113 törzsébe juttatása:

A megtisztított metagenomikai és genomi könyvtárakat elektrokompetens *E. coli* BW25113 törzsébe juttattuk. A bejuttatás során 40-50 μl elektrokompetens sejthez 50 ng plazmid DNS-t adtunk (amely hordozta az inszertet). Az elektroporáció az 4.6 alfejezetben leírtak szerint történt. Egy óra inkubációt követően az elektroporált sejtek egy részét 10x-es, 100x-os és 1000x-es hígításban szélesztettük, a maradék kultúrát pedig 100 ml LB (Luria Berthani) oldatba oltottuk, amely kanamicinnel (50 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban) volt kiegészítve. A kanamicin, olyan szelekciós nyomást biztosít a sejt számára, hogy fenntartsa a plazmidot.

Egy éjszakán át tartó növesztést követően meghatároztuk az elektroporáció hatékonyságát, hasonlóképpen számolva, mint ahogy a ligálásnál határoztuk meg a ligátum transzformálási hatékonyságát (4.6: 1. egyenlet). Az elektroporálás során a cél, hogy az elektroporáció

hatékonysága elérje a ligátum transzformálási hatékonyságának a legalább tízszeresét CFU/ml-ben kifejezve. A legalább tízszeres lefedettség biztosítja, hogy a könyvtárban található ritkább gének is reprezentálva legyenek a funkcionális szűrés során. Ha ez megtörtént, akkor a folyadékkultúrához glicerint adtunk 25%-os végkoncentrációban, majd a sejteket -80 °C-on tároljuk felhasználásig.

4.8 Felhasznált Antibiotikumok:

Az antibiotikumok alkalmazása során fontos figyelembe venni oldhatóságukat, tárolási paramétereiket és hogy milyen oldószerben oldódnak (Dimetil-szulfoxid (DMSO) vagy víz).

Az alkalmazott antibiotikumokat csoportosítva és rövidítéseiket az alábbiakban foglalom össze: **Cephalosporinok:** Ceftobiprole (CEF) (*ADOOQ*), Cefdinir (CFD) (*MedChem Express*), Cefoxitin (FOX) (*Sigma*), Cefepime (FEP) (*Cefepime Dihidroklorid monohidrát- MedChem Express*), Ceftazidin (CAZ) (*Ceftazidime- MedChem Express*); **Karbapenemek:** Meropenem (MER) (*ADOOQ*); Sulopenem (SUL) (*Sigma*); **Monobaktám:** Aztreonam (AZT) (*MedChem Express*); **Penicillin antibiotikumok:** Piperacillin (PIP) (*MedChem Express*)

4.9 Minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározás

A 4.8 pontban említett antibiotikumok esetén meg kellett határozni a minimális gátló koncentrációt (MIC – angolul: **M**inimal **I**nhibitory **C**oncentration). Az MIC az antibiotikum azon legkisebb koncentrációja, ahol a baktérium növekedése látható módon csökken (*Andrews 2001*). Az MIC meghatározást *E. coli* BW25113 egy olyan törzsében végeztük, amelybe elektroporálásra került egy pZE21-p15A plazmid, amely még nem hordozta a méretszelektált metagenomi vagy genomi fragmenst (üres plazmid, inszert nélküli plazmid).

Az MIC méréseket MHB 2 (*Mueller Hinton Broth: Sigma*) tápfolyadékban 96 lyukú lemezen végeztük. Először egy korábbi mérésből adódó MIC értéket vettünk alapul, amely segít meghatározni az alkalmazandó koncentrációsorot a kísérlethez. Majd ezt a korábbi MIC értéket szoroztuk 2^8 -onnal, hogy megkapjuk a kezdő koncentrációértéket. Ha ez túl magasnak bizonyul csökkenthető, de ekkor is 2 hatványaival szorozzuk meg a korábbi MIC értéket. A koncentrációsor kialakításához 12 lépcsős mikrohígítási módszert alkalmaztunk. A lemezen az A és a H sorok voltak a sejtet nem tartalmazó negatív kontrollok, az első oszlop pedig a sejtet igen, de antibiotikumot nem tartalmazó pozitív kontroll. A mérések során, a lemezen a B-től a

G sorig minden lyukba 500.000 sejtet oltottunk. A beoltás után 37 °C-on 130-150 rpm-en rázattuk a lemezeket 24 órán át.

Az inkubáció leteltével 600 nm-en mérjük az optikai denzitást. A mért optikai denzitás mutatta, milyen mértékű növekedés volt az egyes antibiotikum koncentrációkon. A növekedési határértéket az „A” sorban található negatív kontroll alapján határoztuk meg, ezeket az értékeket átlagoljuk, majd levonjuk minden a többi sorban mért értékből, így megkapható a növekedési határérték. Az MIC mérés során alkalmazott több replikátum átlagolásából megállapítható meddig tart a bakteriális növekedés. Ahol megszűnik a mérhető növekedés az lesz MIC. Az MIC-t mint koncentrációt, µg/ml-ben fejezzük ki és ezt az értéket alkalmaztuk az MHB grádiens lemez készítés során.

4.10 Hatásszűrés MHB-grádiens lemezen, rezisztens kolóniák összegyűjtése:

Az MHB2 grádiens lemez készítéséhez szükséges antibiotikum koncentráció grádiens kialakításához elsőként a lemezt megdöntve egy antibiotikummentes csak MHB2-t tartalmazó réteget öntöttünk. A második réteget, amely antibiotikumot is tartalmazott a megfelelő koncentrációban, az első réteg száradása után öntöttük meg (*Weinberg 1959*). A második réteg öntéséhez alkalmazott antibiotikum koncentráció, azaz a kezdő legmagasabb koncentráció meghatározása az a 4.9 alfejezetben leírt módon meghatározott MIC érték figyelembevételével történt. A koncentráció kiszámítása során először próbaként ennek az MIC értéknek vettük a 0,5x; 1x; 2x-esét. Ezt az értéket optimalizáltuk a hatásszűrés során attól függően, hogy a sejtek növekedése meddig tartott a lemezen.

Minden egyes antibiotikumhoz 2 félé lemezt öntünk, az egyik lesz a kontroll, amelyre az *E. coli* BW25113 törzsének egy olyan változatát szélesszük, amelybe elektroporálásra került a pZE21-p15A plazmid, de ez a plazmid még nem hordozza az inszertet (üres plazmid). A kontroll lemezhez szükséges kontroll sejt leoltása a szélesztést megelőző napon történik LB (Luria Berthani) oldatba 50 µg/ml-es végkoncentrációban alkalmazott kanamicin jelenlétében. A kontroll sejtek optikai denzitásának (OD) 600 nm-en történő meghatározását követően az alábbiak (2. egyenlet) szerint kell számolnunk, figyelembe véve, hogyha az OD=1, akkor 5*10⁸-on sejt van 1 ml-ben.

$$\frac{\text{Ligálás hatékonysága (CFU/ml)} * 10}{\text{Mért optikai denzitás} * 5 * 10^8} = \text{sejtmennyiség (ml)}$$

2. egyenlet Kontroll lemezek esetén szükséges sejtmennyiség meghatározása

A kontroll sejtek szélesztése esetén alkalmazandó sejtmennyiség kiszámolható ml-ben egy hányados segítségével. A hányados számlálóját a ligátum transzformálási hatékonyságának 10-szerese képezi, ahol a ligátum transzformálási hatékonysága CFU/ml-ben volt kifejezve (CFU/ml: 1 ml-re vonatkoztatott kolónia képző egység). A hányados nevezőjét a mért optikai denzitás (OD) $5 \cdot 10^8$ -on szorosa adja. Az $5 \cdot 10^8$ -on sejtszám az $OD=1$ -nek megfelelő sejtszám.

A másik lemezre (könyvtáras), egy olyan *E. coli* BW25113-as törzs kerül szélesztésre, amely már hordozza a metagenomikai vagy genomi könyvtárat. A könyvtáras lemezek elkészítéséhez szükséges sejtek a metagenomikai és genomi könyvtárak elektroporálást követően $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kerültek lefagyasztásra. Ezért ezen sejtek esetén meg kell határozni az élő sejtszámot ahhoz, hogy megfelelő mennyiségű sejtet széleszthessünk. Ehhez LB+Kanamicin ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) lemezekre szélesszük ki 10^4 ; 10^5 ; 10^6 -onos hígításban a sejteket. Majd egy éjszakán át $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő növesztést követően határozzuk meg az élő sejtszámot CFU/ml mértékegységben a hígítást figyelembe véve, hogy hány sejt van jelen 1 milliliterben.

A könyvtáras lemezek (olyan sejtek kerülnek szélesztésre erre a lemezre, amelyek hordozzák a metagenomikai vagy genomi könyvtárat) esetén a számolás (3. egyenlet):

$$\frac{\text{Ligálás hatékonysága (CFU/ml)} * 10}{\text{Élő sejtszám} \left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right)} = \text{sejtmennyiség (ml)}$$

3. egyenlet Könyvtáras lemezek esetében szükséges sejtmennyiség meghatározása

A metagenomikai könyvtárat hordozó sejtek esetében szélesztendő sejtmennyiség ml-ben kifejezhető egy hányadossal, amely két tagból áll. A számlálóban a ligátum transzformálási hatékonyságának (CFU/ml-ben kifejezve: 1 ml-re vonatkoztatott kolónia képző egység) 10-szerese és a nevezőben a meghatározott élő sejtszám CFU/ml mértékegységben megadva. Az élő sejtszám is CFU/ml-ben került kifejezésre.

A szélesztés során tehát szükség van a kontroll sejtek optikai denzitására és a metagenomikai könyvtárat hordozó sejtek élő sejtszámára. A szélesztést követően $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on növesztjük a sejteket. Az általam használt antibiotikumok (4.8) esetén nagyjából 18-20 óra növesztést követően ér véget az inkubáció. Hiszen hosszabb inkubációt követően megjelenhetnek szatellita telepek, melyek valójában nem rendelkeznek rezisztencia génnel.

A szélesztést követő napon, az inkubáció leteltével meghatározzuk a rezisztens kolóniák számát és ezeket felborotváljuk, lefagyasztjuk, plazmidot izolálunk belőlük. A 11. ábra megmutatja egy ilyen hatásszűrés eredményét egy kontroll (fent) és egy metagenomikai könyvtárat hordozó lemezen (lent). A rezisztens kolóniák legyűjtése a fronttól 1 cm-re történik. Ez a front lényegében azt jelöli, hogy a lemezen meddig tart a baktérium pázsit. A 11. ábra fekete vonallal jelöltem a kontroll lemezen (fent), hogy hol helyezkedik el a front és kék vonallal pedig a legyűjtés kezdőpontját (lent). (Weinberg 1959)



11. ábra Állati bél mikrobiom alkönyvtár hatásszűrése cefepimmal szemben

Az ábrán kétféle MHB grádiens lemez látható: fent a kontroll, lent a könyvtáras lemez. A fenti kontroll lemezre egy metagenomikai könyvtárat nem hordozó *Escherichia coli* BW25113 törzs került szélesztésre, amely hordozza az inszert nélküli pZE21-p15A plazmidot. Az állati bél mikrobiom alkönyvtár szerbiai mezőgazdasági (SRB) mintákból készült. Ezt az alkönyvtárat hordozó *E. coli* BW25113 sejtek kerültek szélesztésre az alsó (könyvtáras) lemezre. A hatásszűrés mindkét esetben Cefepime (FEP) antibiotikum mellett történt. A rezisztens kolóniák legyűjtéséhez szükséges információk: A kontroll lemezen (fent) fekete vonallal jelöltem a frontot, ettől a fronttól 1 cm-re kerülnek legyűjtésre a rezisztens kolóniák. A front azt jelöli, hogy a lemezen meddig tart a baktérium pászt. A legyűjtés kezdőpontját az alsó lemezen kék vonallal jelöltem.

A rezisztens kolóniák legyűjtését követően azokból plazmidot izolálunk és megmérjük a plazmid DNS koncentrációját. Végül hibrid szekvenálás segítségével azonosítjuk, hogy milyen ARG-k okoztak a hatásszűrés során antibiotikumrezisztenciát. A hatásszűrések eredménye megerősítésre került néhány véletlenszerűen választott antibiotikumon újra elvégezve a szűrést.

4.11 Hibrid szekvenálás a rezisztencia gének azonosítására:

A hatásszűrést követően nyert rezisztens kolóniákból izolált plazmidokat küldjük el szekvenálni úgy, hogy egy hibrid munkafolyamatban ötvözzük a Nanopore és az Illumina szekvenálást (Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt); Mutalik és mtsai. 2019).

A hosszú leolvasásokat (readeket) generáló **Nanopore szekvenálás** határozza meg a metagenomi és genomi DNS fragmenseket (inszerteket, melyek ligálásra kerültek a vektorba). A Nanopore szekvenáláshoz az összes eddig készített hatásszűrésből származó plazmid izolátum összekeverésre került. A különféle szennyeződések és genomi DNS eltávolítása céljából Lamda-exonukleáz (*NEB*) és Exonukleáz I. (*NEB*) enzim kezelés történik. Ezen enzimekből 1000 ng DNS-hez 2,5 U-ot használtunk, az enzimekhez tartozó pufferrel együtt. A reakció összemérését követően 37 °C-on 30 percig inkubáljuk, majd hőinaktiváljuk az enzimet

80 °C-on 10 percig. Ezt követően **DNA Clean & Concentrator** (Zymo) kittel tisztításra kerülnek a plazmid izolátumok és a plazmid DNS koncentrációja is meghatározásra kerül. Ezt követően 5 U/1000 ng SrfI (*NEB*) restrikciós endonukleáz enzim alkalmazásával linearizáljuk az eddig cirkuláris plazmid izolátumokat. A reakció összemérését követően 37 °C-on 1 órát inkubáljuk, majd hőinaktiváljuk az enzimet 65°C-on 20 percig. Ezt követően az összekevert és kezelt plazmid DNS koncentrációját meghatározzuk és Nanopore szekvenálásra küldjük. (*Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt); Mutalik és mtsai. 2019*)

A rövid leolvasásokat (readeket) generáló **Illumina szekvenálás** során arra kapunk választ, hogy az egyes minták mely szelekcióból származtak, mint például melyik antibiotikummal szemben történt szelekció, illetve milyen könyvtáron, alkönyvtáron. Ez úgy lehetséges, hogy minden inszert előtt és mögött (upstream és downstream) található egy 10 nukleotid hosszúságú random szakasz (barcode) a pZE21-p15A plazmidon, melyek segítségével azonosítható, hogy melyik inszertről van szó pontosan.

Ahhoz, hogy azonosítani tudjuk, melyik inszertről van szó a barcodeokat amplifikálni kell. Az upstream és downstream barcodeok amplifikálásához Illumina specifikus primerpárok (forward és reverz) szükségesek. A hatásszűrésekből származó plazmidokat **Phusion PCR**-rel amplifikáltuk, a tervezett Illumina specifikus primerpárok mellett, melyek megtervezése egy korábbi munkához (*Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt)*) köthető.

A barcodeok amplifikálásához szükséges Phusion PCR reakció összeállítása 20 µl-re az alábbiak alapján történt: 15 ng plazmid DNS; 4 µl 5x GC puffer; 0,2 µl Phusion Polimeráz (*Thermo Fisher Scientific*); 0,6 µl DMSO; 2,5 mM-os dNTP-ből 1,6 µl; 10 µM-os forward és reverz primerből 1 µl, nukleáz mentes víz. Ezt követően PCR gépbe kerültek a minták és az alábbi program került lefuttatásra: predenaturáció 95 °C 5 perc; denaturáció 95 °C 30 mp; hibridizáció 59 °C 30 mp; elongáció 72 °C 5 perc; majd a végső hibajavításokra 72 °C 7 perc. A denaturáció, hibridizáció és elongáció 30 cikluson át zajlott.

Ezt követően a plazmid amplifikációjának ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel történt 50-50 ng-ot futtatva a plazmid DNS-ből GelRed (*Biotium*) interkalálódó nukleinsav festékkel festve. A gélfuttatáshoz Low Range (25 bp - 700 bp) DNS létrát (*Thermo Fisher Scientific*) alkalmaztunk. Ha az ellenőrzés során az amplifikált plazmid szakaszok azonos méretűek voltak (137 bp), akkor 1:1 koncentráció arányban összekeverésre kerültek. Az összekevert plazmidok ezt követően 0,75%-os agaróz gélen lettek megfuttatva, Low Range DNS létra mellett, GelRed (*Biotium*) nukleinsav festéket alkalmazva. A gélfuttatás után egy 137 bp-os DNS szakaszt

izoláltunk gélből Monarch DNA Gel Extraction Kittel (*NEB*). Ezt követően mértük a gélből izolált plazmid DNS keverék koncentrációját és ezt követően került elküldésre a minta Illumina szekvenálásra (*Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt); Mutalik és mtsai. 2019*)

A két szekvenálás (Illumina és Nanopore) eredményének összefűzése bioinformatikusokat bevonva történt.

5 Eredmények és értékelésük:

5.1 Elkészített metagenomikai könyvtárak mérete:

A metagenomikai könyvtárépítés egy többlépcsős folyamat, amely magában foglalja a különböző környezetekből történő mintagyűjtést, majd ezekből a környezeti mintákból genomi DNS izolálást és fragmentálást, majd a megfelelő méretű fragmenteket egy alacsony kópiaszámú plazmidba ligáljuk, mely során így metagenomikai és genomi könyvtárak jönnek létre (*Crofts, Gasparini, és Dantas 2017; dos Santos és mtsai. 2017*). A munkafolyamat egyes lépéseit *Anyagok, eszközök és módszerek: fejezet* foglalja össze.

Az *1. táblázat* írja le a készített metagenomikai könyvtárak jellemzőit. 4 fő könyvtártípus került létrehozásra: a patogén mintákat felölelő klinikai könyvtár, az emberi és állati bél mikrobiomot tartalmazó bél mikrobiom könyvtár, a szennyvízmintákat tartalmazó szennyvíz könyvtár és az indiai talajmintákat tartalmazó talaj könyvtár. Ezen könyvtárak kisebb alkönyvtárakból épülnek fel.

A megépített könyvtárak jellemezhetőek méretük szerint. Miután meghatároztuk a ligátum transzformálási hatékonyságát (CFU/ml-ben, *1. táblázatban* feltüntetve) egy átlagos inszertmérettel (2 kbp) felszorozzuk, akkor megkapjuk a könyvtárméretet (bázispárban (bp) kifejezve). A kész metagenomikai könyvtárak méretét az *Eredmények és értékelésük: 5.1* alfejezete írja le. A 4 fő könyvtár mérete külön-külön (ha az átlagos inszert méretet 2000 bp-nek vesszük): a szennyvíz könyvtár 9,38 Gbp; a klinikai könyvtár 15,65 Gbp; a bél mikrobiom könyvtár 20,712 Gbp; a talajkönyvtár 10 Gbp méretű. Méret szempontjából tehát a bél mikrobiom könyvtár és a klinikai könyvtár a legnagyobb. Összeségében, ha az összes könyvtárat nézzük, akkor ez egy 55,742 Gbp nagyságú könyvtár (átlagos inszert méret 2000 bp). Az összes metagenomikai és genomi könyvtár több mint 18000 baktérium genomot fed le, ha átlagosan 3 millió bázispáros (bp-os) bakteriális genommal számolunk. Ezeket a könyvtárakat az *E. coli* BW25113 törzsbe juttattam be és különféle β -laktám antibiotikumokkal

szemben végrehajtott hatásszűrésben használtam fel. Természetesen a megépített könyvtárak másfajta funkcionális metagenomikai szűrésre is felhasználhatók, más gazdában is. (*Apjok és mtsai. 2022(publikálás alatt)*)

1. táblázat Készített metagenomikai könyvtárak áttekintése:

Könyvtárnév	Alkönyvtárak neve	Rövidítés	Ligátum transzformálási hatékonysága (CFU/ml)	Könyvtárméret (Gbp)
Szennyvíz könyvtár	Szennyvíz	WASTE	4688785	9,38
Klinikai könyvtár	Új patogén alkönyvtár	NEW Patho	1825000	3,65
	Patogén alkönyvtár	Patho 6M	6000000	12
Bél mikrobiom könyvtár	Állati eredetű bél mikrobiom alkönyvtár (magyar mezőgazdaság)	HUN	3070800	6,142
	Állati eredetű bél mikrobiom alkönyvtár (szerb mezőgazdaság)	SRB	5287117	10,57
	Emberi bél mikrobiom alkönyvtár	GUT	2000000	4
Talajkönyvtár	Indiai talajkönyvtár	SOIL	5000000	10

Az 1. táblázat harmadik oszlopában a ligátum transzformálási hatékonysága került kifejezésre 1 ml-re vonatkoztatott kolónia képző egységben (CFU/ml- a CFU angolul: Colony forming Unit). A negyedik oszlopban a könyvtárméret került megadásra gigabázipárban (Gbp) kifejezve, ez úgy történt meg, hogy mindenhol a ligátum transzformálási hatékonysága megszorzásra került az átlagos inszertmérettel (2000 bp). Azon alkönyvtárakat, melyek előző kutatásokból származnak dőlttel jelölöm, de megemlítem, hiszen ezen könyvtárak hatásszűrése is része a dolgozatomnak.

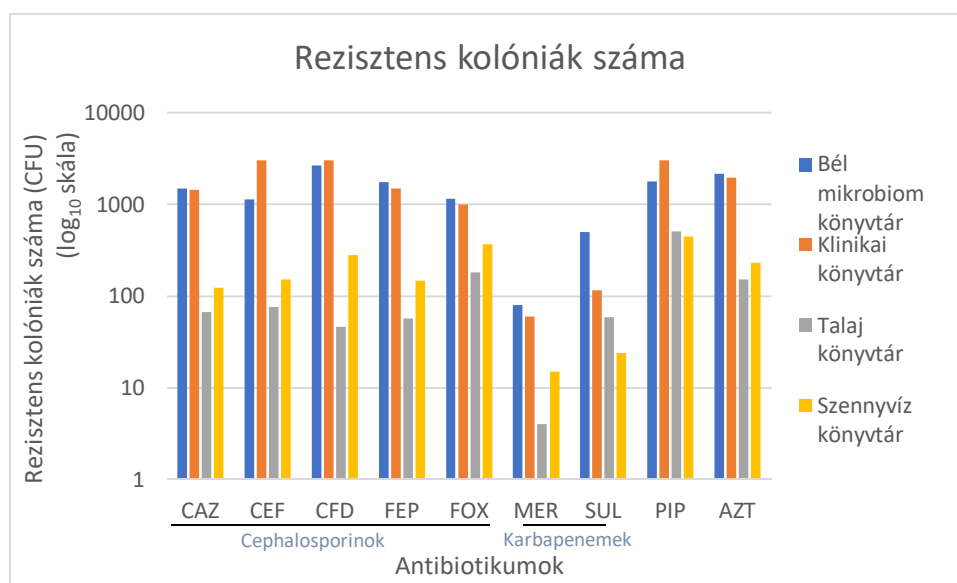
5.2 Rezisztens kolóniaszámok a hatásszűrés során és főbb összefüggéseik:

Az elkészített metagenomikai és genomi könyvtárakat *E. coli* BW25113-as törzsébe juttattam és ezen metagenomikai és genomi könyvtárakat hordozó baktérium kultúrákat hatásszűrés alá vettem 9 különböző antibiotikummal szemben. Ezen antibiotikumok, olyan béta-laktám antibiotikumok, amelyek gyakran kerülnek felhasználásra a klinikumban és egy részük kombinálható béta-laktamáz inhibitorokkal.

A hatásszűrést MHB grádiens lemezen végeztem és a hatásszűrésből származó rezisztens kolóniákat összegyűjtöttem, majd azokból szekvenálásra küldtem, ennek módját az [5.3 alfejezet](#)

foglalja össze. A hatásszűrés eredményeként a különböző kolóniaszámokat a Függelék: [1.kiegészítő_táblázata](#) mutatja meg. Azon esetekben, ahol nagyon nagy számú volt a rezisztens kolóniák száma és szinte számolhatatlan mennyiségben voltak rezisztens kolóniák, ott 3000+ jelölést alkalmaztam.

A módszer segítségével összesen több mint 30000 rezisztens kolóniát azonosítottunk. Az ezekből származó ARG-k azonosítása szekvenálással folyamatban van. Természetesen a rezisztens kolóniák számából még nem következtethetünk a rezisztencia gének számára, hiszen egy ARG több kolóniában is előfordulhat. Mindenesetre néhány nagyságrendi következtetés levonható a könyvtárakat illetően ([12. ábra](#)):



12. ábra Rezisztens kolóniák számának eloszlása a különböző antibiotikumokkal szemben

A 12.ábra esetében az x-tengely az alkalmazott antibiotikumok rövidítését, az y tengely a rezisztens kolóniák számát mutatja logaritmikus skálán ($10^{log_{10}}$ CFU-ban (kolónia képző egység)). Alkalmazott antibiotikumok és rövidítéseik: **Cephalosporinok:** Cefiazidim (CAZ); Cefitobiprole (CEF); Cefdinir (CFD); Cefepime (FEP); Cefoxitin (FOX); **Karbapenemek:** Meropenem (MER); Sulopenem (SUL); **Monobaktám:** Aztreonam (AZT); **Penicillin antibiotikum:** Piperacillin (PIP). A színkódok magyarázata: kék- bél mikrobiom könyvtár, narancs- klinikai könyvtár, szürke- talaj könyvtár, sárga- szennyvíz könyvtár.

Ahogy azt a [12. ábra](#) szemlélteti, a klinikai könyvtár és a bél mikrobiom könyvtár esetében szinte minden antibiotikummal szemben nagy számú rezisztens kolóniát sikerült azonosítani. A talaj könyvtárban és a szennyvíz könyvtárban is sikerült számos rezisztens kolóniát azonosítani, viszont kevesebbet, mint az előbbi két könyvtárnál. Ennek oka lehet a könyvtárak méretkülönbsége, hiszen a klinikai és a bél mikrobiom könyvtárak mérete nagyobb (több mint 15 Gbp), mint a talaj és a szennyvíz könyvtárak mérete (9-10 Gbp). A könyvtárméret pedig összefüggésben lehet azzal, hogy mennyi ARG van jelen az adott könyvtárban (*Su és mtsai. 2014*). A nagyobb könyvtárméret mellett több ARG azonosítható, ezáltal nagyobb rezisztens kolóniaszámot is adnak ezek a könyvtárak. Emellett a bél mikrobiom könyvtár esetén az állati

alkönyvtárak közül a szerb mezőgazdasági mintákból származó alkönyvtár nagy számú rezisztens kolóniát produkált (*Függelék: 1.kiegészítő táblázat*), melynek oka a mezőgazdaságban felhasznált nagy mennyiségű antibiotikum (*Manyi-Loh és mtsai. 2018*). Ez szintén hozzájárulhat a bél mikrobiom könyvtár esetén tapasztalt magas rezisztens kolóniaszámhoz.

A karbapenemek esetén kevés rezisztens kolóniát azonosítottam. Ennek oka az lehet, hogy a kísérletben használt karbapenemeket nem alkalmazzák a klinikumban olyan nagy arányban, mint a cephalosporinokat. A meropenemet, mint „utolsó lehetőség” antibiotikumot alkalmazzák, míg a sulopenem még csak a klinikai vizsgálatok 3.fázisában van, így széles körben még nem alkalmazzák (*Osei Sekyere 2016*) (*World Health Organization 2019*).

Fontos kiemelni, hogy a ceftobiprollal szemben, amely egy 5.generációs cephalosporin, hasonlóan magas rezisztens kolóniaszámokat kaptunk, mint más antibiotikumokkal szemben (*12. ábra*). Ez azt jelenti, hogy már a környezetben előfordulnak olyan ARG-k, amelyek rezisztenciát biztosítanak ezzel az antibiotikummal szemben, annak ellenére, hogy nemrég került forgalomba (*Giacobbe és mtsai. 2019; World Health Organization 2019*).

5.3 Hibrid szekvenálással azonosított ARG-k:

Az 5.2 alfejezetben említett hatásszűrésből nyert antibiotikum rezisztens kolóniák összegyűjtésre kerültek, majd ezekből plazmidot izoláltam és Illumina és Nanopore szekvenálásra készítettem elő ezen plazmidokat. A Nanopore szekvenálás segítségével határozzuk meg, hogy melyik ARG-ről van szó és az Illumina szekvenálásból pedig, hogy melyik könyvtárból, alkönyvtárból és melyik antibiotikumról származott az adott ARG (*Apjok és mtsai. 2022- publikálás alatt; Mutalik és mtsai. 2019*).

A nagyobb könyvtárak létrehozása előtt két kisebb méretű könyvtárból azonosítottunk ARG-ket szekvenálással az *Anyagok, eszközök és módszerek 4.11* alfejezetében leírtak szerint. Itt a cél leginkább az volt, hogy a különféle antibiotikumokkal szemben azonosítsunk ARG-ket.

A *2. táblázatban* az azonosított ARG-k közül a β -laktamázokat mutatom be kategorizálva. Az ARG-k azonosítása a CardRes adatbázis (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) segítségével történt bioinformatikai analízis eredményeként. A további azonosított ARG-k a *Függelék: 2.kiegészítő táblázatában* találhatóak meg.

2. táblázat Két kisebb méretű, állati eredetű mikrobiom alkönyvtárból azonosított ARG-k:

Antibiotikum	Rezisztencia gén név	Karakterizálás (Ambler/Bush-Jacoby Medeiros)	Hivatkozás
CFD	TEM-213	Ambler A/ 2b	(Arlet és mtsai. 1999; Tessier és mtsai. 1998; The Comprehensive Antibiotic Resistance Database é. n.)
CFD	ACC-3	Ambler C/1	(Girlich és mtsai. 2000, 1)
CFD	blaPAU-1_1_MH053445	Ambler A/2be	(J. Wang és mtsai. 2019)
CFD	blaZ_92_FKWG01000001	Ambler A	(McLaughlin, Murray, és Rabinowitz 1981; Pence és mtsai. 2015; Yuan és mtsai. 2011)
FOX	TEM-213	Ambler A/ 2b	(Arlet és mtsai. 1999; Tessier és mtsai. 1998; The Comprehensive Antibiotic Resistance Database é. n.)
SUL	PDC-86	Ambler C/1	(Berrazeg és mtsai. 2015)
CFD	NDM-9	Ambler B (MBL)/3	(X. Wang és mtsai. 2014)
CFD	CblA-1	Ambler A/2e	(Philippon és mtsai. 2016; Smith, Bennett, és Parker 1994)
CFD	NDM-15 (NDM-1 variáns)	Ambler B (MBL)/3	(Moellering 2010)
MER	NDM-15 (NDM-1 variáns)	Ambler B (MBL)/3	(Moellering 2010)
SUL	NDM-15 (NDM-1 variáns)	Ambler B (MBL)/3	(Moellering 2010)

A 2.táblázat első oszlopában a hatássűrűsítéshez felhasznált antibiotikumok rövidítése látható: cefdinir (CFD); cefoxitin (FOX); sulopenem (SUL); meropenem (MER). Félkövérrel jelöltem az egyik alkönyvtárból származó ARG-eket, dőlttel pedig a másik alkönyvtárból származó ARG-eket. A harmadik oszlopban a leírt rezisztencia gének karakterizálása látható Ambler (A, B, C, D) és Bush-Jacoby-Medeiros karakterizálás szerint (1,2,3 és betűkkel jelölt alcsoportok).

Összefoglalva, szinte mindegyik Ambler osztályból sikeresen azonosítottunk ARG-eket (2.táblázat). Legnagyobb arányban, mint várható volt, az Ambler A osztályból kerültek ki β -laktamázok (TEM-213, CblA-1, blaPAU (Arlet és mtsai. 1999; Tessier és mtsai. 1998)). Azért azonosítottunk leginkább Ambler A β -laktamázokat, mert a kísérletben felhasznált antibiotikumok leginkább ezt a csoportot célozzák (Bush és Bradford 2019). A blaPAU egy olyan β -laktamáz, amely gyakran asszociálódik mobilis genetikai elemekkel és ezáltal gyorsan elterjedhet a környezetben (J. Wang és mtsai. 2019). Emellett azonosítottunk Ambler C osztályba tartozó β -laktamázokat is (ACC-3, PDC-86) (Berrazeg és mtsai. 2015; Girlich és mtsai. 2000).

Azonosítottunk továbbá Ambler B csoportba tartozó β -laktamázokat is (NDM-15, NDM-9) (Moellering 2010; X. Wang és mtsai. 2014). Az NDM-15 és az NDM-9 szekvenciálisan viszonylag távolabb állnak egymáshoz képest hiszen, az NDM-9 az aktív centrumában hordoz mutációt az NDM-15-höz képest és nagyobb katalitikus hatékonysággal is rendelkezik az NDM-9 (Verma 2017). Az NDM-ek széles körben elterjedtek az utóbbi időben, viszont nincs még ezen csoporttal szemben elfogadott hatásos antibiotikum, illetve antibiotikum- β -laktamáz inhibitor kombináció (Bush és Bradford 2019).

Megfigyelhető, hogy a cefdinirrel (cephalosporin) szemben több lehetséges rezisztencia gén is azonosításra került. Egy számomra lehetséges magyarázat erre az, hogy ez összefüggésben állhat a könyvtárak diverzitásával és méretével, minél diverzebb és nagyobb a könyvtár annál több rezisztencia gén lesz azonosítható egy antibiotikummal szemben (*Su és mtsai. 2014*).

Fontos megfigyelés lehet továbbá az, hogy az NDM-15-öt több antibiotikummal szemben is azonosítottuk, amelyek eltérő β -laktám csoportba tartozhatnak. Jól látható, hogy cefdinirrel (CFD), ami egy cephalosporin és karbapenemekkel, meropenemmel (MER) és sulopenemmel (SUL) szemben is megjelent ugyanaz a karbapenemáz, az NDM-15. Ez azt jelenti, hogy az NDM-15 nem csupán karbapenemáz, hanem multidrogrezisztenciát is biztosít. (*Sun és mtsai. 2018*). Az ilyen multidrogrezisztenciát biztosító ARG-k pedig nagyon gyakran képesek plazmid mediált módon horizontális géntranszfer segítségével szétterjedni (*Sommer és mtsai. 2017*).

Az NDM-15 a fentiekből következően tehát a cephalosporinok és a karbapenemek hidrolízisére is képes. Ennek okozata abban keresendő, hogy az NDM-15 egy olyan széles szubsztrát specificitással rendelkező β -laktamáz, amely szinte mindegyik β -laktám antibiotikum hidrolízisére képes. Az NDM-ek esetén előforduló cephalosporináz és karbapenemáz aktivitás arra vezethető vissza, hogy a cephalosporinok (vagy penicillinek) hidrolíziséért felelős fehérje részlet részét képezi a karbapenemek hidrolíziséért felelős fehérje résznek. Ez felfogható úgy, hogy az NDM-ek rendelkeznek a cephalosporinok hidrolíziséért felelős alapkészlettel és emellett még a karbapenemáz aktivitásért felelős részekkel is (*Sun és mtsai. 2018*).

A [2.táblázat](#) nem tér ki más mechanizmusokra, mint az efflux pumpák működése vagy a célfehérjék módosítása. Megemlíthető, hogy azonosításra kerültek egyéb ARG-k is a hatásszűrés folyamán (*Függelék: 2.kiegészítő táblázat*). Ezek közül említésre méltó a mecC_4_HG515014 gén által kódolt fehérje, amely a PBP módosítása révén csökkenti a β -laktám antibiotikumok affinitását a sejtfalhoz (*Paterson, Harrison, és Holmes 2014*). Továbbá azonosításra került néhány efflux pumpa, többek között a CmeC és a RamA szabályozó fehérje. A RamA egy multidrog efflux pumpa kifejeződését szabályozza, amely számos antibiotikum kijuttatását idézi elő a közegbe (*Frye és mtsai. 2010; Ricci, Blair, és Piddock 2014*). Természetesen az egyes mechanizmusok kombinálódhatnak és ezen efflux pumpák is társulhatnak például egy β -laktamáz által kivitelezett enzimátikus hasítás mellé (*Bonomo 2017; Crofts, Gasparrini, és Dantas 2017*).

Az azonosított ARG-k listája a jövőben még bővülni fog. A funkcionális metagenomikai szűrés tehát lehetőséget teremt arra, hogy a környezetben már jelenlévő funkcionális ARG-ket azonosítsunk és ajánlásokat fogalmazzunk meg az egyes antibiotikumok alkalmazását illetően.

6 Összefoglalás:

A különböző környezetekben előforduló nagymértékű antibiotikum felhasználás antibiotikum rezisztencia forrópontokat teremt, ahol nagy arányban fordulnak elő ARG-k. Ezen ARG-k gyakran plazmidokon találhatóak és horizontális géntranszferrel terjedhetnek egyik baktériumról a másikra. Ezáltal a környezetünkben jelen lehetnek olyan ARG-k, amelyek akár a klinikai fejlesztés alatt álló antibiotikumokkal szemben is rezisztenciát biztosítanak (*Gwenzi, Musiyiwa, és Mangori 2020; Sommer és mtsai. 2017*). Ezen rezisztencia forrópontok lefedésére egy korábbi munkában (*Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt)*) három metagenomikai könyvtárat hoztak létre.

Munkám során, további négy alkönyvtárat (2 állati bél mikrobiom alkönyvtár, 1 patogén alkönyvtár, szennyvíz könyvtár) hoztam létre, melyek segítségével kibővíthetővé vált az eredeti három könyvtár. Összegzésképpen tehát a munkámhoz rendelkezésre állt egy bél mikrobiom könyvtár, egy klinikai könyvtár, egy szennyvíz könyvtár és egy indiai talaj könyvtár. Így lehetségessé vált a környezetben előforduló funkcionális ARG-k széleskörű feltérképezése lefedve a rezisztencia forrópontokat.

Ezen génkönyvtárak funkcionális szűrését 9 β -laktám antibiotikumokkal szemben elvégezve számos rezisztens kolóniát azonosítottam. Elmondható, hogy a rezisztens kolóniák száma összefüggésben állt a könyvtármérettel (*Su és mtsai. 2014*). Két kisebb alkönyvtár szekvenálása során pedig azonosítottunk ARG-ket, köztük számos β -laktamázt. Ezek között kiemelendő az NDM-15 egy olyan multidrogrezisztenciát okozó, széles szubsztrátspecifitással rendelkező ARG, amelynek eredeti formája az NDM-1 Ázsiából származik, de már Európában is megjelent (*Sun és mtsai. 2018, European Centre for Disease Prevention and Control 2012; Moellering 2010*). Elmondható, hogy az NDM-ek széleskörű elterjedése horizontális géntranszferrel problémát jelent, hiszen nincs még forgalomban olyan béta-laktám antibiotikum és béta-laktamáz inhibitor kombináció, amely hatásos lenne velük szemben. (*2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development- WHO jelentés*)

Az új béta-laktamáz inhibitorok fejlesztése ma már kritikus feladattá vált, hiszen egyre szélesebb körben terjednek el az MBL β -laktamázok, melyek ellen kevés inhibitor hatásos

jelenleg. Ilyen MBL-ek ellen hatásos inhibitorok lehetnek majd a taniborbaktám és a xeruborbaktám (*2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development - WHO jelentés*). Ezeket különféle cephalosporinokkal és karbapenemekkel kombinálva figyelembe véve a megfelelő farmakokinetikai és farmakodinamikai összepárosíthatóságot felvehető a harc a széles körben terjedő β -laktamázokkal szemben (*Bush és Bradford 2019*).

Távlati terveim között szerepel a β -laktamázokkal rendelkező rezisztens baktériumokkal szemben néhány antibiotikum és β -laktamáz inhibitor kombináció alkalmazása, melyek preklinikai vagy klinikai fázisban vannak. Ezek az eredmények pedig hozzájárulhatnak majd ahhoz, hogy ajánlásokat fogalmazzunk meg, mely antibiotikum és béta-laktamáz inhibitor kombinációk alkalmazhatóak jól napjainkban (*2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development*).

7 Függelék:

1. kiegészítő táblázat Rezisztens kolóniaszámok a különböző alkönyvtáraknál a különböző antibiotikumokkal szemben

Antibiotikum	WASTE	SRB	HUN	PATHO	GUT	SOIL
CEF	153	697	35	3000	403	76
FOX	366	820	36	1005	290	181
CFD	279	2045	115	3000	502	46
SUL	24	232	6	116	260	59
MER	15	37	43	60	0	4
CAZ	124	823	235	1435	433	67
FEP	148	1380	117	1502	261	57
AZT	232	696	131	1955	1327	153
PIP	444	1280	151	3000	348	511

A táblázat első oszlopában a hatásszűréshez felhasznált antibiotikumok rövidítései láthatóak: ceftobiprole (CEF); ceftaxime (FOX); ceftazidim (CFD); sulopenem (SUL); meropenem (MER); ceftazidim (CAZ); cefepime (FEP); Aztreonam (AZT); piperacillin (PIP). A második oszloptól az utolsó oszlopig a hatásszűrésben részt vett alkönyvtárak rövidítései láthatóak: szennyvíz alkönyvtár (WASTE); állati bél mikrobiom alkönyvtár szerb mezőgazdasági mintákból (SRB); állati mikrobiom alkönyvtár magyar mezőgazdasági mintákból (HUN); patogén (al)könyvtár (PATHO); emberi bél mikrobiom alkönyvtár (GUT); indiai talajmintákból felépülő (al)könyvtár (SOIL).

2. kiegészítő táblázat Hibrid szekvenálással azonosított rezisztenciagének

Antibiotikum	Rezisztencia gén név	Rezisztencia mechanizmus
CFD	cmeC	antibiotikum efflux
CFD	ramA	antibiotikum efflux, csökkent permeabilitás antibiotikumra
CFD	TEM-213	antibiotikum inaktiváció
CFD	ACC-3	antibiotikum inaktiváció
CFD	Burkholderia pseudomallei Omp38	csökkent permeabilitás az antibiotikumra
CFD	OmpA	csökkent permeabilitás az antibiotikumra
CFD	blaPAU-1_1_MH053445	enzimatis módosítás
CFD	penA_1_AF515059 (Ohnishi és mtsai. 2010)	enzimatis inaktiváció
CFD	mecC_4_HG515014 (Paterson, Harrison, és Holmes 2014)	target módosítás
CFD	blaZ_92_FKWG01000001	enzimatis inaktiváció
FOX	TEM-213	antibiotikum inaktiváció
FOX	penA_1_AF515059	enzimatis inaktiváció
FOX	mecC_4_HG515014	target módosítás
SUL	PDC-86	antibiotikum inaktiváció
SUL	ramA	antibiotikum efflux, csökkent permeabilitás antibiotikumra
CFD	NDM-9	antibiotikum inaktiváció
CFD	CblA-1	antibiotikum inaktiváció

CFD	NDM-15	antibiotikum inaktiváció
FOX	ramA	antibiotikum efflux, csökkent permeabilitás antibiotikumra
MER	NDM-15	antibiotikum inaktiváció
MER	ramA	antibiotikum efflux, csökkent permeabilitás antibiotikumra
SUL	ramA	antibiotikum efflux, csökkent permeabilitás antibiotikumra
SUL	NDM-15	antibiotikum inaktiváció

Az első oszlopban a hatásszűréshez felhasznált antibiotikumok rövidítése látható: cefdinir (CFD); ceftioxin (FOX); sulopenem (SUL); meropenem (MER). A második oszlopban az azonosított antibiotikumrezisztencia-gén (ARG) került feltüntetésre. Itt félkövérrel jelöltem azokat, amelyek az egyik alkönyvtár esetében kerültek azonosításra, dőlttel pedig a másik alkönyvtár esetén azonosításra kerültek ARG-k láthatóak. A harmadik oszlopban az azonosított rezisztencia mechanizmus látható a CardRes (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) adatbázis alapján.

8 Irodalomjegyzék:

„2021 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis”. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240047655> (2022. október 2.).

„Alexander Fleming | Biography, Education, Discovery, Nobel Prize, & Facts | Britannica”. <https://www.britannica.com/biography/Alexander-Fleming> (2022. október 25.).

Andrews, J. M. 2001. „Determination of Minimum Inhibitory Concentrations”. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 Suppl 1: 5–16.

„Antibiotic Classification & Mechanism - Basic Science - Orthobullets”. <https://www.orthobullets.com/basic-science/9059/antibiotic-classification-and-mechanism> (2022. október 25.).

Apjok, Gábor és mtsai. 2022. „Characterization of antibiotic resistomes by reprogrammed bacteriophage-enabled functional metagenomics in clinical strains”.

Arlet, G., S. Goussard, P. Courvalin, és A. Philippon. 1999. „Sequences of the Genes for the TEM-20, TEM-21, TEM-22, and TEM-29 Extended-Spectrum Beta-Lactamases”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(4): 969–71.

Basak, Pijush, Arpita Biswas, és Maitree Bhattacharyya. 2020. „Chapter 24 - Exploration of Extremophiles Genomes through Gene Study for Hidden Biotechnological and Future Potential”. In *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, szerk. Richa Salwan és Vivek Sharma. Academic Press, 315–25. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128183229000241> (2022. november 9.).

Berrazeg, M. és mtsai. 2015. „Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(10): 6248–55.

- „BioRender”. <https://biorender.com/> (2022. október 14.).
- Blair, Jessica M. A. és mtsai. 2015. „Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance”. *Nature Reviews Microbiology* 13(1): 42–51.
- Bonomo, Robert A. 2017. „ β -Lactamases: A Focus on Current Challenges”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7(1): a025239.
- Bush, Karen, és Patricia A. Bradford. 2016. „ β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(8): a025247.
- . 2019. „Interplay between β -Lactamases and New β -Lactamase Inhibitors”. *Nature Reviews Microbiology* 17(5): 295–306.
- Chambers, Henry F., és Frank R. DeLeo. 2009. „Waves of Resistance: Staphylococcus Aureus in the Antibiotic Era”. *Nature Reviews Microbiology* 7(9): 629–41.
- Crofts, Terence S., Andrew J. Gasparrini, és Gautam Dantas. 2017. „Next-Generation Approaches to Understand and Combat the Antibiotic Resistome”. *Nature Reviews Microbiology* 15(7): 422–34.
- Durão, Paulo, Roberto Balbontín, és Isabel Gordo. 2018. „Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance”. *Trends in Microbiology* 26(8): 677–91.
- Elder, David P., Martin Kuentz, és René Holm. 2016. „Antibiotic Resistance: The Need For a Global Strategy”. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105(8): 2278–87.
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2012. *Updated ECDC Risk Assessment on the Spread of New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM) and Its Variants within Europe*. LU: Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2900/14890> (2022. november 8.).
- Fleming, Alexander. 1945. „Nobel díjas előadás”.
- FOPH, Federal Office of Public Health. „How Does Antibiotic Resistance Spread?” <https://www.bag.admin.ch/bag/en/home/krankheiten/infektionskrankheiten-bekaempfen/antibiotikaresistenzen/wie-breiten-sich-antibiotikaresistenzen-aus-.html> (2022. szeptember 18.).
- Frye, Jonathan G. és mtsai. 2010. „Development of a DNA Microarray to Detect Antimicrobial Resistance Genes Identified in the National Center for Biotechnology Information Database”. *Microbial Drug Resistance* 16(1): 9–19.
- Giacobbe, Daniele Roberto és mtsai. 2019. „Ceftobiprole: drug evaluation and place in therapy”. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 17(9): 689–98.
- Girlich, D. és mtsai. 2000. „Biochemical-Genetic Characterization and Regulation of Expression of an ACC-1-like Chromosome-Borne Cephalosporinase from *Hafnia Alvei*”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(6): 1470–78.

- Gwenzi, Willis, Kumbirai Musiyiwa, és Lynda Mangori. 2020. „Sources, Behaviour and Health Risks of Antimicrobial Resistance Genes in Wastewaters: A Hotspot Reservoir”. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8(1): 102220.
- Kintses, Bálint és mtsai. 2019. „Phylogenetic Barriers to Horizontal Transfer of Antimicrobial Peptide Resistance Genes in the Human Gut Microbiota”. *Nature Microbiology* 4(3): 447–58.
- Kirby, William M. M. 1944. „Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant Staphylococci”. *Science* 99(2579): 452–53.
- Kunhikannan, Shalini és mtsai. 2021. „Environmental Hotspots for Antibiotic Resistance Genes”. *MicrobiologyOpen* 10(3): e1197.
- Magiorakos, A.-P. és mtsai. 2012. „Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance”. *Clinical Microbiology and Infection* 18(3): 268–81.
- Manyi-Loh, Christy, Sampson Mamphweli, Edson Meyer, és Anthony Okoh. 2018. „Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications”. *Molecules* 23(4): 795.
- Max, MAURIN. 2018. „Antibiotics, Antibiotic Resistance and Environment”. *Encyclopedia of the Environment*. <https://www.encyclopédie-environnement.org/en/health/antibiotics-antibiotic-resistance-and-environment/> (2022. október 28.).
- McLaughlin, J. R., C. L. Murray, és J. C. Rabinowitz. 1981. „Unique Features in the Ribosome Binding Site Sequence of the Gram-Positive Staphylococcus Aureus Beta-Lactamase Gene”. *The Journal of Biological Chemistry* 256(21): 11283–91.
- Moellering, Robert C. 2010. „NDM-1 — A Cause for Worldwide Concern”. *New England Journal of Medicine* 363(25): 2377–79.
- Mutalik, Vivek K. és mtsai. 2019. „Dual-Barcoded Shotgun Expression Library Sequencing for High-Throughput Characterization of Functional Traits in Bacteria”. *Nature Communications* 10(1): 308.
- Osei Sekyere, John. 2016. „Current State of Resistance to Antibiotics of Last-Resort in South Africa: A Review from a Public Health Perspective”. *Frontiers in Public Health* 4: 209.
- Pankey, G. A., és L. D. Sabath. 2004. „Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections”. *Clinical Infectious Diseases* 38(6): 864–70.
- Papp-Wallace, Krisztina M., Andrea Endimiani, Magdalena A. Taracila, és Robert A. Bonomo. 2011. „Carbapenems: Past, Present, and Future”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(11): 4943–60.
- Paterson, Gavin K., Ewan M. Harrison, és Mark A. Holmes. 2014. „The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus”. *Trends in Microbiology* 22(1): 42–47.

- Pence, Morgan A. és mtsai. 2015. „Beta-Lactamase Repressor BlaI Modulates Staphylococcus Aureus Cathelicidin Antimicrobial Peptide Resistance and Virulence”. *PloS One* 10(8): e0136605.
- Philippon, Alain, Patrick Slama, Paul Dény, és Roger Labia. 2016. „A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes”. *Clinical Microbiology Reviews* 29(1): 29–57.
- Rammelkamp, Charles H., és Thelma Maxon. 1942. „Resistance of Staphylococcus Aureus to the Action of Penicillin.” *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 51(3): 386–89.
- „ResistanceMap - Antibiotic Resistance”. <https://resistancemap.cddep.org/> (2022. szeptember 18.).
- Ricci, Vito, Jessica M. A. Blair, és Laura J. V. Piddock. 2014. „RamA, which controls expression of the MDR efflux pump AcrAB-TolC, is regulated by the Lon protease”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69(3): 643–50.
- dos Santos, Débora Farage Knupp, Paula Istvan, Betania Ferraz Quirino, és Ricardo Henrique Kruger. 2017. „Functional Metagenomics as a Tool for Identification of New Antibiotic Resistance Genes from Natural Environments”. *Microbial Ecology* 73(2): 479–91.
- Smith, C. J., T. K. Bennett, és A. C. Parker. 1994. „Molecular and Genetic Analysis of the Bacteroides Uniformis Cephalosporinase Gene, CblA, Encoding the Species-Specific Beta-Lactamase”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38(8): 1711–15.
- Sommer, Morten O. A., Christian Munck, Rasmus Vendler Toft-Kehler, és Dan I. Andersson. 2017. „Prediction of Antibiotic Resistance: Time for a New Preclinical Paradigm?” *Nature Reviews Microbiology* 15(11): 689–96.
- Su, Jian Qiang és mtsai. 2014. „Functional Metagenomic Characterization of Antibiotic Resistance Genes in Agricultural Soils from China”. *Environment International* 65: 9–15.
- Sun, Zhizeng és mtsai. 2018. „Differential Active Site Requirements for NDM-1 β -Lactamase Hydrolysis of Carbapenem versus Penicillin and Cephalosporin Antibiotics”. *Nature Communications* 9(1): 4524.
- Tessier, F., C. Arpin, A. Allery, és C. Quentin. 1998. „Molecular Characterization of a TEM-21 Beta-Lactamase in a Clinical Isolate of Morganella Morganii”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(8): 2125–27.
- „The Comprehensive Antibiotic Resistance Database”. <https://card.mcmaster.ca/ontology/37790> (2022. szeptember 29.).
- Vaidya, Varsha K. 2011. „Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance by Extended-Spectrum β Lactamase-Producing Enterobacteriaceae”. *Journal of Laboratory Physicians* 3(1): 37–42.
- Verma, Ved. 2017. „New Delhi Metallo Beta Lactamase: Menace and its Challenges”. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 11.

- Wang, Jian és mtsai. 2019. „PAU-1, a Novel Plasmid-Encoded Ambler Class A β -Lactamase Identified in a Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolate”. *Infection and Drug Resistance* 12: 3827–34.
- Wang, Xiaojuan és mtsai. 2014. „Novel NDM-9 Metallo- β -Lactamase Identified from a ST107 *Klebsiella Pneumoniae* Strain Isolated in China”. *International Journal of Antimicrobial Agents* 44(1): 90–91.
- Weinberg, Eugene D. 1959. „Gradient Agar Plates”. *The American Biology Teacher* 21(8): 347–50.
- World Health Organization. 2019. *2019 Antibacterial Agents in Clinical Development: An Analysis of the Antibacterial Clinical Development Pipeline*. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330420> (2022. október 13.).
- Yuan, Ji, Dar-Chone Chow, Wanzhi Huang, és Timothy Palzkill. 2011. „Identification of a β -lactamase inhibitory protein variant that is a potent inhibitor of *Staphylococcus* PC1 β -lactamase”. *Journal of molecular biology* 406(5): 730–44.

9 Ábrajegyzék:

1. ábra A horizontális géntranszfer főbb formái (BioRender programmal készítve; Durão, Balbontín, és Gordo 2018).....4
2. ábra Antibiotikumok gyakori támadáspontjai a baktériumban, illetve az ezekkel szemben kialakuló bakteriális rezisztencia mechanizmusok (BioRender programmal készített ábra.; Blair és mtsai. 2015; módosított ábra: Max 2018 alapján).....5
3. ábra Antibiotikumrezisztencia forrópontok (Federal Office of Public Health: How does antibiotic resistance spread? online forrás).....7
4. ábra Funkcionális metagenomikai munkafolyamat (BioRender programmal készített ábra).....8
5. ábra Javallott antibiotikumok aránya az orvoslásban (Bush és Bradford 2016)- alapján módosított ábra.....9
6. ábra A cephalosporinok 3. generációjával szemben rezisztens *Escherichia coli* előfordulási aránya (ResistanceMap - Antibiotic Resistance honlapról származó ábra.).....10
7. ábra Fragmentáltság ellenőrzés agaróz gélelektroforézissel.....14
8. ábra Próbaemésztés MluCI enzimmel.....15
9. ábra Méretszelekció ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel16
10. ábra pZE21_p15A plazmid felépítése (Apjok és mtsai. 2022 (publikálás alatt)).....17
11. ábra Állati bél mikrobiom alkönyvtár hatásszűrése cefepimmal szemben.....23

12. ábra Rezisztens kolóniák számának eloszlása a különböző antibiotikumokkal szemben	
.....	27

9.1 Táblázatjegyzék

1. táblázat Készített metagenomikai könyvtárak áttekintése:	26
2. táblázat Két kisebb méretű, állati eredetű mikrobiom alkönyvtárból azonosított ARG-k:	28

10 Köszönetnyilvánítás

A dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségükért szeretnék néhány embert megemlíteni. Köszönet illeti témavezetőmet Dr. Kintses Bálintot, aki koordinálta és segítette munkámat. Továbbá szeretnék köszönetet mondani még Számel Mónikának és Méhi Orsolyának, akik számos hasznos tanáccsal láttak el. Illetve a laboratóriumi munkálatokban történő segítségért köszönet illeti Kovács Dorinát és Dr. Lantos Ildikót. További köszönet illeti bioinformatikusunkat Stirling Tamást. Illetve mindenkinek, aki a Transzlációs Mikrobiológiai csoportban dolgozik.